# UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI MINYAK ATSIRI DAUN KEMANGI (*Ocinum basilicum* L.*)* DAN DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia)* TERHADAP *Escheriachia coli* ATTC 25922

**Oleh:**

**Ricilianie**
**18123681 A**

**FAKULTAS FARMASI**
**UNIVERSITAS SETIA BUDI**
**SURAKARTA**
**2016**

# UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI MINYAK ATSIRI DAUN KEMANGI (*Ocinum basilicum* L.) DAN DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia)* TERHADAP *Escheriachia coli* ATTC 25922

***SKRIPSI***

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai derajat Sarjana Farmasi (S.Farm)*
*Program Studi Ilmu Farmasi Falkutas pada Falkutas Farmasi Universitas Setia Budi*


**Oleh:**

**Ricilianie**
**18123681 A**


**FAKULTAS FARMASI**
**UNIVERSITAS SETIA BUDI**
**SURAKARTA**
**2016**

**PENGESAHAN SKRIPSI**

berjudul

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI MINYAK ATSIRI DAUN KEMANGI (*Ocinum basilicum* L.) DAN DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia)* TERHADAP *Escheriachia coli* ATTC 25922**

Oleh:
Ricilianie
18123681 A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal: Juni 2016

Mengetahui,
Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi
Dekan,

Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt.

Pembimbing Utama,

Ismi Rahmawati, M.Si., Apt

Pembimbing Pendamping,

Dra. Lina Susanti, M.Si.

Penguji:

1. Mamik Ponco Rahayu, M.Si., Apt 1.....
2. Ganet Eko P, M.Si., Apt 2.....
3. Dra. Lina Susanti, M.Si. 3.....
4. Ismi Rahmawati, M.Si., Apt 4.....

**PERSEMBAHAN**

*Dan segala sesuatu yang kamu lakukan dengan perkataan atau perbuatan, lakukanlah itu dalam nama Tuhan yesus, sambil mengucap syukur oleh Dia kepada Allah, Bapa kita.*

*Kolose 3:17*

*Janganlah hendaknya kamu kuatir tentang apapun juga, tetapi nyatakanlah dalam segala hal keinginanmu kepada Allah dalam doa dan permohonan dengan ucapan syukur.*

*Damai sejahtera Allah yang melampaui segala akal, akan memelihara hati dan pikiranmu dalam Kristus Yesus*

*Filipi 4:6-7*

Persembahanku syukurku untuk:

Tuhan Yesus Kristus

Ayah dan Ibu yang selalu memberi cinta kasih

Seluruh keluarga dan sahabat

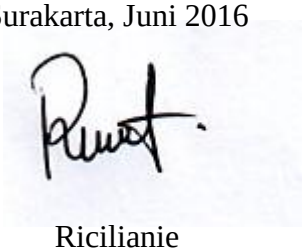
Teman-teman seperjuangan

Agama, Bangsa, Negara, Almamater tercinta

## PERNYATAAN

Saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka. Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, Juni 2016



Ricilianie

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepadaTuhan Yesus Kristus atas berkat dan kasihNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul: **"UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI MINYAK ATSIRI DAUN KEMANGI (*Ocinum basilicum* L.) DAN DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia)* TERHADAP *Escheriachia coli* ATTC 25922"** maksud dan tujuan penulis menyusun skripsi ini guna memenuhi persyaratan untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi dalam ilmu Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi. Syukur dan terimakasih kepada Tuhan Yesus Kristus beserta keluarga dan para sahabat. Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan dan motivasi bimbingan berbagai pihak, maka dengan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi, yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada penulis.
2. Prof. Dr. R.A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi
3. Universitas Setia Budi.
4. Ismi Rahmawati, M.Si., Apt. dan Dra, Lina Susanti, M.si., selaku pembimbing yang telah bersedia membimbing dan mengarahkan penulis.
5. Bapak/Ibu tim penguji skripsi, penulis mengucapkan terima kasih atas masukan, kritik, dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
6. Kedua Orang tuaku yang selalu memberikan kekuatan, cinta, kasih, doa, semangat, dan sumber motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini.
7. Segenap Dosen dan karyawan Universitas Setia Budi.

8. Teman-teman seperjuangan S1 Farmasi, anak-anak teori 5 khususnya teman-teman grup minyak atsiri (Nur W, Novi E, Ika P) dan kost “Fortuna” (Dewi A, Theodora A), kost” Beta” (Febri N, Clara P, Lawini D) terimakasih banyak atas persahabatan, waktu, motivasi, canda tawa kita yang sangat berharga.
9. Pimpinan, staf, karyawan Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TO2T), Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.
10. Adik-kakak dan saudara-saudara yang telah memberikan kasih sayang, perhatian dan doa sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
11. Semua pihak tidak bisa penulis disebutkan satu persatu yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis sangat menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu segala saran, kritik dan petunjuk yang bersifat membangun akan penulis terima dengan senang hati agar skripsi ini dapat memberikan mamfaat khususnya bagi penulis dan ilmu pengetahuan bagi pembaca serta untuk perkembangan ilmu Farmasi.

Surakarta, Juni 2016

Ricilianie

## DAFTAR ISI

Halaman


HALAMAN JUDUL ..... i

PENGESAHAN SKRIPSI ..... ii

PERSEMBAHAN ..... iii

PERNYATAAN ..... iv

KATA PENGANTAR ..... v

DAFTAR ISI ..... vii

DAFTAR GAMBAR ..... x

DAFTAR TABEL ..... xi

DAFTAR LAMPIRAN ..... xii

INTISARI ..... xiv

ABSTRACT ..... xv

BAB I PENDAHULUAN ..... 1

A. Latar Belakang Masalah ..... 1
B. Rumusan Masalah ..... 5
C. Tujuan Penelitian ..... 6
D. Kegunaan Penelitian ..... 6

BAB II TINJAUAN PUSTAKA ..... 7

A. Tanaman Kemangi ..... 7
   1. Sistematika tanaman ..... 7
   2. Nama daerah ..... 8
   3. Morfologi tanaman ..... 8
   4. Kandungan kimia ..... 8
   5. Kegunaan ..... 9
B. Tumbuhan Jeruk Nipis ..... 10
   1. Sistematika Tumbuhan ..... 10
   2. Nama lain ..... 10
   3. Morfologi tumbuhan ..... 11
   4. Kandungan kimia ..... 11
   5. Kegunaan ..... 12
C. Minyak Atsiri ..... 12
   1. Deskripsi minyak atsiri ..... 12

2. Metode isolasi minyak atsiri dengan metode uap air ..... 13
D. Kromatogtafi Gas – Spektroskopi Massa ..... 14
E. Tinjauan Bakteri ..... 15
1. Klasifikasi ..... 15
2. Morfologi dan Identifikasi ..... 15
3. Patogenesis ..... 16
4. Struktur toksin ..... 17
F. Kotrimoksazol ..... 17
G. Kombinasi obat ..... 18
H. Media ..... 19
I. Uji Aktivitas Antibakteri ..... 19
1. Metode difusi ..... 20
1.1 Metode lubang (perforasi) ..... 20
1.2. Metode cakram kertas ..... 20
2. Metode Dilusi ..... 20
2.1. Metode pengenceran tabung ..... 20
2.2. Metode pengenceran agar ..... 21
J. Landasan Teori ..... 21
K. Hipotesis ..... 25

BAB III METODE PENELITIAN ..... 26

A. Populasi dan Sampel ..... 26
1. Populasi ..... 26
2. Sampel ..... 26
B. Variabel Penelitian ..... 26
1. Identifikasi variabel utama ..... 26
2. Klasifikasi variabel utama ..... 27
3. Definisi operasional variabel utama ..... 28
C. Bahan dan Alat ..... 29
1. Bahan dan Sampel ..... 29
2. Alat ..... 30
D. Jalannya Penelitian ..... 30
1. Identifikasi tanaman ..... 30
2. Pengambilan sampel ..... 30
3. Isolasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis ..... 31
4. Pemeriksaan organoleptis minyak atsiri daun Kemangi dan daun Jeruk nipis ..... 31
5. Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (GC-MS) ..... 31
6. Penetapan indeks bias minyak atsiri ..... 32
7. Penetapan bobot jenis minyak atsiri ..... 32
8. Sterilisasi alat dan bahan ..... 32
9. Identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25292 dengan media selektif ..... 33
10. Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram ..... 33

11. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan berdasarkan uji biokimia ..... 34
12. Pembuatan suspensi bakteri..... 35
13. Pengujian aktivitas bakteri dengan metode Difusi ..... 35
14. Pengujian aktivitas bakteri dengan metode Dilusi ..... 36
15. Analisis Hasil ..... 37

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN ..... 41

1. Identifikasi tanaman ..... 41
2. Pengambilan bahan..... 41
3. Hasil isolasi minyak atsiri daun kemangi dan jeruk nipis ..... 41
4. Hasil organoleptis minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis ..... 42
5. Hasil kromatografi gas-spektropotometri massa (GCMS)..... 43
6. Hasil indeks bias minyak atsiri..... 45
7. Penetapan bobot jenis minyak atsiri ..... 45
8. Hasil identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25292 dengan media selektif ..... 46
9. Hasil identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan gram ..... 47
10. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 berdasarkan uji biokimia..... 48
11. Pembuatan suspensi bakteri..... 50
12. Hasil pengujian aktivitas bakteri minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis ..... 51

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN ..... 56

A. Kesimpulan..... 56
B. Saran ..... 56

DAFTAR PUSTAKA ..... 57

LAMPIRAN..... 61

## DAFTAR GAMBAR

Halaman


Gambar 1. Daun kemangi ..... 7

Gambar 2. Daun jeruk nipis ..... 10

Gambar 3. Skema alur pembuatan minyak atsiri Daun kemangi *(Ocimun basilicum* L.*)* dan jeruk nipis *(citrus aurantifolia)* dengan metode destilasi uap air ..... 38

Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri destilasi kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi ..... 39

Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan jeruk nipis dengan konsentrasi 100%, 50%, 20%; 12,5; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19% kontrol positif (+); kontrol negatif (-) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode dilusi ..... 40

Gambar 6. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan media selektif ..... 47

Gambar 7. Hasil mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 ..... 47

Gambar 8. Hasil identifikasi berdasarkan uji biokimia *Escherichia coli* ATCC 25922 ..... 48

# DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 1. Kadar minyak atsiri ..... 42

Tabel 2. Hasil uji organoleptis minyak atsiri daun kemangi (*Ocinum basilicum L.)* ..... 43

Tabel 3. Hasil uji organoleptis minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) ..... 43

Tabel 4. Hasil identifikasi komponen minyak atsiri daun kemangi ..... 43

Tabel 5. Hasil identifikasi komponen minyak atsiri daun jeruk nipis ..... 44

Tabel 6. Hasil penetapan indeks bias minyak atsiri daun kemangi (*Ocinum basilicum L.)* dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) ..... 45

Tabel 7. Hasil bobot jenis minyak atsiri daun kemangi (*Ocinum basilicum* L.) ..... 46

Tabel 8. Hasil bobot jenis minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia)* ..... 46

Tabel 9. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 berdasarkan uji biokimia ..... 49

Tabel 10. Diameter hambat tunggal dari uji difusi minyak atsiri ..... 51

Tabel 11. Diameter hambat kombinasi dari uji difusi minyak atsiri ..... 51

Tabel 12. Hasil inokulasi minyak atsiri daun kemangi terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 di medium Endo Agar ..... 53

## DAFTAR LAMPIRAN

Halaman


Lampiran 1. Surat keterangan hasil determinasi tanaman kemangi (*Ocinum basilicun* L.) dan tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)..... 61

Lampiran 2. Foto tanaman ..... 62

Lampiran 3. Foto alat destilasi uap air ..... 63

Lampiran 4. Foto alat inkubator dan oven ..... 64

Lampiran 5. Foto alat inkas dan timbangan ..... 65

Lampiran 6. Foto alat refraktometer dan alat Gc-MS ..... 66

Lampiran 7. Hasil destilasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis . 67

Lampiran 8. Foto hasil biakan *Escherichia coli* ATCC 25922 ..... 68

Lampiran 9. Hasil pemeriksaan indeks bias minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis ..... 68

Lampiran 10 Foto hasil difusi dan inokulasi tunggal minyak atsiri daun kemangi, daun jeruk nipis dan kontrol positif (+) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ..... 69

Lampiran 11. Foto hasil difusi dan inokulasi kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ..... 70

Lampiran 12. Foto hasil dilusi minyak atsiri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 ..... 71

Lampiran 13. Foto hasil goresan dilusi minyak atsiri pada media *Endo Agar* .... 72

Lampiran 14 Perhitungan hasil prosentase rendemen minyak atsiri daun kemangi ..... 73

Lampiran 15. Perhitungan hasil prosentase rendemen minyak atsiri daun jeruk nipis ..... 73

Lampiran 16. Hasil perhitungan indeks bias minyak atsiri..... 74

Lampiran 17. Perhitungan hasil bobot jenis minyak atsiri daun kemangi ..... 75

Lampiran 18. Perhitungan hasil bobot jenis minyak atsiri daun jeruk nipis..... 77

Lampiran 19. Hasil analisis GCMS minyak atsiri daun kemangi ..... 79

Lampiran 20. Hasil analisis GCMS minyak atsiri daun jeruk nipis..... 81

Lampiran 21. Hasil perhitungan diameter daerah hambatan (mm) ..... 83

Lampiran 22. Pembuatan konsentrasi kontrimoksazol ..... 84

Lampiran 23. Hasil analisisa SPSS ..... 85

# INTISARI

**RICILIANIE., 2016, UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KOMBINASI MINYAK ATSIRI DAUN KEMANGI (Ocinum basilicum L.) DAN DAUN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia)* TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* ATCC 25922, SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.**

Daun kemangi dan daun jeruk nipis merupakan salah satu tanaman herbal penghasil minyak atsiri dan dapat dimanfaatkan sebagai obat**.** Daun kemangi dapat menyembuhkan pilek, diare, sembelit, mengatasi sakit maag. Jeruk nipis digunakan untuk meredakan radang tenggorokan, demam, perawatan kulit. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Metode yang digunakan untuk menghasilkan minyak atsiri adalah metode uap dan air, kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis menggunakan kombinasi (1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1) dan metode dilusi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis menggunakan konsentrasi yaitu 100%, 50%, 20%; 12,5; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan diameter daerah hambatan konsentrasi (1:3) mempunyai aktivitas antibakteri yang paling optimal terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yaitu 23,66 mm dan hasil konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) yaitu 12,5 %.

Kata kunci: minyak atsiri, daun kemangi, daun jeruk nipis, *Escherichia coli*

## ABSTRACT

**RICILIANIE., 2016, ANTIBACTERIAL ACTIVITIES TEST OF ESSENTIAL OIL COMBINATION OF BASIL (*Ocinum basilicum* L.) AND LIME (*Citrus aurantifolia)* LEAVES AGAINST BACTERIA *Escherichia coli* ATCC 25922, THESIS, FACULTY OF PHARMACY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.**

Basil and lime leaves was one of the herbal plant essential oil and can be used as a drug. Basil leaves can cure colds, diarrhea, constipation, overcome heartburn. Lime leaves has been used to relieve sore throat, fever, skin care. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of a combination of essential oils of basil leaves and lime leaves against *Escherichia coli* ATCC 25922.

The method used to produce the essential oils of basil leaves and lime was a method of steam and water, then testing antibacterial activity against Escherichia coli ATCC 25922 using diffusion dan dilution methods. Methods of diffusion of essential oils of basil leaves and lime leaves using a combination (1: 1, 1: 2, 1: 3, 2: 1, 3: 1) and the essential oil dilution method basil leaves and lime leaves using a concentration of 100%, 50%, 20%; 12.5; 6.25%; 3.125%; 1.56%; 0.78%; 0.39%; 0.19%;

The results of this study indicated that diameter bottleneck area of concentrations (1:3) have the most optimal antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 is 23.66 mm and Minimum Bactericide Concentration (MBC) was 12.5%.


Keywords: essential oil, basil leaves, lime leaves, *Escherichia coli*

# BAB I

# PENDAHULUAN

## A. Latar Belakang Masalah

Gangguan pencernaan merupakan salah satunya penyakit diare, menyebabkan kematian diantaranya pada balita. Studi Mortalitas dan Riset Kesehatan Dasar dari tahun ke tahun diketahui bahwa diare masih menjadi penyebab utama kematian balita di Indonesia (Jane S. 2011). Bakteri penyebab diare adalah *Shigella, Salmonella spp, Copylobac terjejuni, Escherichia coli* dan *Entamo ebahistolitica.*

Penyakit diare merupakan penyakit yang banyak diderita masyarakat Indonesia sejak dulu. Masyarakat telah lama mengenal obat dari bahan alam, banyak digunakan sebagai pengobatan penyakit yang dideritanya, masyarakat lebih tergantung pada bahan yang dapat diperoleh dari alam dan hutan disekitarnya. Keanekaragaman hayati memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai tanaman obat yang berasal dari alam tersebut, banyak digunakan karena keberadaannya yang mudah didapat dan ekonomis. Tanaman obat telah menjadi bagian integral dari peradaban manusia. Tanaman obat juga telah di gunakan oleh lebih dari 80% dari populasi dunia sebagai bahan dasar perawatan kesehatan (Whambete 2009). Tanaman obat yang bisa dikembangkan adalah tanaman kemangi dan jeruk nipis.

Daun kemangi dan daun jeruk nipis merupakan salah satu tanaman herbal penghasil minyak atsiri dan dapat dimanfaatkan sebagai obat yang banyak tumbuh

khususnya di Indonesia. Secara tradisional tanaman kemangi digunakan untuk mengobati perut kembung atau masuk angin, deman, melancarkan ASI, rematik, selain itu juga digunakan untuk lalapan dan sebagai bumbu dalam masakan. Seduhan teh asli dinegara India dan sebagian di Afrika, digantikan dengan seduhan daun kemangi, minuman tersebut biasanya disajikan pada saat pergantian musim, pada saat orang terkena pilek, batuk maupun demam.

Banyak dilakukan penelitian tentang kemampuan ekstrak maupun minyak atsiri tumbuhan sebagai agen antibakteri (Ramesh & Satakopan 2010). Minyak atsiri adalah minyak eteris (*essential oils*) atau (*volatile oils*) yang merupakan ekstrak alami dari berbagai jenis tumbuhan (Gunawan 2009). Minyak atsiri di dalam genus ocinum mengandung senyawa eugenol, osimen, pinen, linalool, sineol, geraniol, metil kavikol, metil sinamat, sitral, kamfor, timol, benzyl, sitronella, lineon, dan lain-lain (Martono *et al* 2004). Beberapa penelitian uji aktivitas antibakteri minyak atsiri telah banyak dilakukan. Minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) mempunyai aktivitas antibakteri dengan nilai KHM 0,25% terhadap *Eschrerichia coli* (Maryati *et al* 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Sutiyami dan Nuryani 2014 tentang uji aktivitas minyak atsiri kemangi *(Ocinum sanctum* L.*)* pada berbagai kuman diare. Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri kemangi mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri diare. Penelitian tersebut didapatkan hasil pada konsentrasi 25 % dengan diameter daerah hambat 6,5 mm terhadap bakteri *Escherichia coli*

Tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah salah satu tumbuhan berkhasiat obat yang masih banyak digunakan oleh masyarakat. Jeruk nipis dapat

digunakan untuk meredakan radang tenggorokan, demam, bau badan, perawatan kulit, rambut rontok, ketombe dan menghindari kegemukan (Sarwono 2003), serta memiliki efek antimikroba baik terhadap bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif (Onyeagba *et al* 2004).

Penelitian yang dilakukan tentang uji antibakteri dan antioksidan minyak atsiri daun jeruk nipis terhadap bakteri *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacterfaecalis*, *Salmonella paratyphi*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Serratiamarcescens* didapatkan bahwa minyak atsiri daun jeruk nipis konsentrasi 20%, 10%, 5%, dan 1% mempunyai aktivitas antibakteri terhadap semua bakteri uji dengan terbentuknya zona hambat. Penelitian tersebut didapat hasil bahwa minyak atsiri daun jeruk nipis mampu menghambat *Escherichia coli* dengan konsentrasi 20%, 10%, 5%, dan 1% yang masing-masing konsentrasi membentuk diameter zona hambat 33 mm, 30 mm, 27 mm, 22 mm (Reddy *et al* 2012).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Kon *et al* 2012 aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri herba timi dan jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli*. Penelitian tersebut didapat hasil diameter zona hambat minyak atsiri jeruk nipis adalah 6.8±0.7 dan kombinasi minyak atsiri herba timi dan jeruk nipis adalah 15.8±2.3. Selanjutnya, pada aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri Timi herba dan kemangi didapatkan diameter zona hambat, pada minyak atsiri kemangi diameter zona hambat yaitu 8,9±0,6 dan kombinasi minyak atsiri herba timi dan kemangi didapatkan hasil yaitu 9,4±1,0 membuktikan bahwa dari kombinasi minyak atsiri mempunyai aktivitas antibakteri lebih besar dari pada aktivitas minyak atsiri tunggalnya, diharapkan dengan pekombinasian kedua

minyak atsiri daun kemangi dan jeruk nipis mempunyai efek yang lebih efektif dari bentuk tunggalnya.

Dalam penggunaan kombinasi obat dapat menimbulkan interaksi, sehingga kemungkinan akan terjadi peningkatan maupun penurunan dari efek obat. Efek kombinasi dari beberapa agen kimia yang berbeda terdapat 3 jenis interaksi antara dua agen kimia yaitu aditif, sinergis dan antagonis. Hasil penelitian bahan aktif minyak atsiri pada daun kemangi yang berperan sebagai antibakteri adalah kandungan senyawa dari minyak astiri yaitu 1,8-cineole, ß-Bisabolene,methyl eugenol (Dzen *et al* 2003). Senyawa yang dihasilkan minyak atsiri daun jeruk nipis antara lain *limonen, β pinen, sabinen, (E)-β–Ocimene, α-pinen, myrcene, linalool, geranial, neral, citronellol, geranilasetat, nerilasetat, geraniol* dan *nerol* (Lota *et al.* 2002). Senyawa yang termasuk golongan hidrokarbon monoterpen yang bersifat sebagai antibakteri (Dongmo *et al* 2009). Kedua minyak atsiri ini diharapkan untuk memperoleh efek sehingga diketahui adanya efek sinergisme jika kedua minyak atsiri tersebut dikombinasikan.

Berdasarkan uraian diatas perlu dilakukan penelitian uji aktivitas kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.*)* dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Escherichia coli*. Penelitian yang telah dilakukan bahwa tanaman kemangi dan jeruk nipis masing-masing mempunyai aktivitas terhadap bakteri dan belum memperoleh keterangan kombinasi minyak atsiri dari kedua bahan tersebut, dengan cara pekombinasian diharapkan kombinasi minyak atsiri mempunyai aktivitas yang lebih efektif dibandingkan bentuk tunggalnya sebagai antibakteri.

Penelitian ini metode yang digunakan untuk mengisolasi minyak atsiri daun kemangi dan jeruk nipis adalah destilasi uap air atau pengukusan. Penyulingan cara ini mirip dengan perebusan tetapi antara bahan dan air dibatasi oleh penyekat, berupa saringan berlubang. Penelitian dengan metode uap air lebih baik karena menghasilkan rendemen minyak yang tinggi dan mutu lebih baik dan proses penguapannya lebih cepat sehingga waktu penyulingan lebih pendek (Guenther 1990).

## B. Rumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini adalah:

Pertama, Apakah kombinasi (1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1) dari minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mempunyai aktivitas anti bakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922?

Kedua, pada perbandingan kombinasi berapakah minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mempunyai aktivitas antibakteri yang paling efektif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922?

Ketiga, berapa Konsentrasi Bunuh Minimun (KBM) dari kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.*)* dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922?

## C. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

Pertama, mengetahui kombinasi (1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1) dari minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.*)* dan jeruk nipis (*Citrus aurantioflia*) mempunyai aktivitas anti bakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, mengetahui perbandingan kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum L.)* dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mempunyai aktivitas antibakteri yang paling efektif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922?

Ketiga, mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimun (KBM) dari kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

## D. Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang aktivitas kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai antibakteri dan konsentrasi yang paling efektif dari kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum L.)* dan jeruk nipis (*Citrus aurantiflia*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Memberikan motivasi pada masyarakat untuk menggunakan zat antibakteri dari bahan alam dan hasil penelitian diharapkan dapat menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya.

# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## A. Tanaman Kemangi

### 1. Sistematika tanaman

Adapun klasifikasi dari Kemangi (*Ocimum basilicum* L) adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Tubiflorae

Suku : Lamiaceae

Marga : Ocinum

Jenis : *Ocinum basilicum* L. (Depkes RI 2001)

**Gambar 1. Daun kemangi**

**2. Nama daerah**

Menurut Mangoting (2005) suraung, lampes (sunda); lampes (Jawa tengah); kemangek (Madura); uku-uku (Bali); lufe-lufe (Ternate); Bramakusu (Minahasa/manado).

**3. Morfologi tanaman**

Kemangi merupakan tanaman semak semusim dengan tinggi 30-150 cm. batangnya berkayu, segi empat, beralur, bercabang, dan memiliki bulu berwarna hijau. Daunnya tunggal dan berwarna hijau. Daun berbentuk bulat telur, ujungnya runcing, pangkal tumpul, tepi bergerigi, dan pertulangan daun menyirip. Bunga majemuk berbentuk tandan, memiliki bulu dan tangkai pendek yang berwarna hijau. Mahkota bunga telur dengan warna putih keunguan. Buah berbentuk kotak dan berwarna cokelat tua. Bijinya berukuran kecil, tiap buah terdiri atas empat biji yang berwarna hitam. Akarnya tunggang dan berwarna putih kotor (Mangoting 2005).

**4. Kandungan kimia**

Pada daun kemangi memiliki senyawa aktif seperti minyak atsiri, alkaloid, saponin, flavonoid, triterpenoid, steroid, tannin dan fenol. Beberapa golongan kandungan kimia tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Sifat dari penghambatan ini disebut sebagai bakteriostatik atau bakteriosida (Hadipoentyanti dan Wahyuni, 2008).

Komponen senyawa minyak atsiri daun kemangi dengan metode destilasi uap adalah linalool, estragol, metil sinamat, sineol, isokariofllen, dan kubeben (Kadinan *dkk* 2007). Penelitian terdahulu menggunakan kandungan flavonoid daun

kemangi dapat memberikan efek antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Klebisiella pneumonia*. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa kombinasi dari kedua senyawa flavonoid daun kemangi yaitu orientin dan visenin memberikan efek antibakteri yang sinergis (saling menguatkan) dibandingkan dengan penggunaan salah satu dari kedua senyawa flavonoid tersebut (Ali dan Savita, 2012).

Daun kemangi merupakan tanaman herbal yang dapat digunakan sebagai antibakteri. Bahan aktif pada daun kemangi yang berperan sebagai antibakteri adalah kandungan senyawa dari minyak astiri yaitu 1,8-cineole, ß-Bisabolene, methyl eugenol. Ketiga bahan tersebut memiliki sifat larut terhadap etanol dan dapat menyebabkan kerusakan membran sel bakteri. Membran sel berfungsi untuk permeibilitas selektif dan proses transpor aktif sehingga mampu menjaga komposisi internal dalam bakteri. Apabila membran sel rusak maka protein dan lipid dalam bakteri akan keluar dan bahan makanan untuk menghasilkan energi tidak dapat masuk sehingga mengakibat kematian bakteri (Dzen *et al* 2003)

**5. Kegunaan**

Minyak atsiri kemangi digunakan sebagai bahan campuran pembuatan obat dan untuk perawatan tubuh seperti sabun mandi, biang parfum, body lotion, minyak gosok, permen pelega tenggorokan dan juga minyak aroma terapi (Manawean 2010). Daun kemangi dapat menyembuhkan kepala, pilek, diare, sembelit, gangguan ginjal, mengatasi sakit maag, perut kembung, masuk angina, kejang-kejang, dan badan lesu. Selain itu minyak atsiri kemangi juga bisa digunakan sebagai pelancar ASI, mengatasi demam, batuk, gangguan pencernaan,

muntah-muntah infeksi usus, radang lambung serta radang dalam usus. Aroma kemangi dapat menolak gigitan nyamuk (Dharmayanti 2013).

## B. Tumbuhan Jeruk Nipis

### 1. Sistematika Tumbuhan

Sistematika tumbuhan Jeruk tipis *(Aurantifolia)* menurut (Sarwono 2003) adalah sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Bangsa : Rutales

Suku : Rutaceae

Marga : Citrus

Jenis : Citrus Aurantifolia

**Gambar 2. Daun jeruk nipis**

### 2. Nama lain

Limau Tipis (Melayu), Jeruk Nipis (Jawa), jeruk alit, kaputungan, lemo (bali); dongaceat (bima); mudu telong (Flores); mudak enelo(Solor); delo-makii

(pulau roti); jeru (pulau sawu), lemo ape, lemo kapasa (Bugis); unisefe (Ambon); acid lime, sour lime (Inggris); limmece, limah (Arab); zhi qiao (Cina), (Putra WS 2015).

**3. Morfologi tumbuhan**

Tumbuhan Jeruk tipis *(Aurantifolia)* merupakan tumbuhan perdu, tinggi ± 3½cm. Memiliki batang yang berkayu, bulat, berduri, putih kehijauan. Daun majemuk, elips atau bulat telur, pangkal membulat, ujung tumpul, tepi beringgit, panjang 2-9 cm, lebar 2-5 cm, bersayap, hijau. Bunga mrupakan bunga Majemuk atau tunggal, diketiak daun atau diujung batang, diameter 1½-2½ cm, kelopak bentuk mangkok, berbagi empat sampai lima, diameter 0,4-0,7 cm, putih kekuningan, benang sari 0,5-0,9 cm, tangkai sari 0,35-0,40 cm, kuning, bakal buah bulat, hijau kekuningan, kepala putik bulat, tebal, kuning, daun mahkota empat sampai lima, bulat telur atau lanset, panjang 0,7-1¼ cm, lebar ¼-½ cm, putih. Buah buni, diameter 3½-5 cm, masih muda hijau setelah tua kuning. Biji berbentuk bulat telur, pipih, putih kehijauan. Akar tunggang, bulat, putih kekuningan (Sarwono 2003).

**4. Kandungan kimia**

Pada minyak atsiri bagian utama yang paling penting adalah terpenoid yang sering terdapat pada fraksi atsiri yang tersuling-uap. Minyak atsiri menyebabkan wangi, harum, atau bau yang khas pada banyak tumbuhan (Harbone 1987). Senyawa yang dihasilkan minyak atsiri daun jeruk nipis antara lain *limonen, β pinen, sabinen, (E)-β–Ocimene, α-pinen, myrcene, linalool, geranial, neral, citronellol, geranilasetat, nerilasetat, geraniol* dan *nerol* (Lota *et al.* 2002).

Senyawa yang termasuk golongan hidrokarbon monoterpen yang bersifat sebagai antibakteri (Dongmo *et al* 2009).

**5. Kegunaan**

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) digunakan untuk meredakan radang tenggorokan, demam, bau badan, perawatan kulit, rambut rontok, ketombe dan menghindari kegemukan (Sarwono 2003), serta memiliki efek antimikroba baik terhadap bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif (Onyeagba *et al* 2004). Selain buah, daun jeruk nipis sering digunakan sebagai obat (Reddy *et al* 2012)

## C. Minyak Atsiri

**1. Deskripsi minyak atsiri**

Minyak atsiri adalah zat berbau yang terkandung dalam tanaman. Minyak ini disebut juga minyak menguap karena pada suhu biasa (pada suhu kamar) mudah menguap pada suhu terbuka, didalam minyak atsiri terdapat komponen utama adalah isprenoid, karena molekulnya tersusun dari unit-unit isoprene. Sifat umum dari minyak atsiri antara lain tersusun oleh beberapa macam komponen senyawa, memiliki bau khas, mempunyai rasa getir, menggigit tergantung dari jenis macam komponen penyusunnya, umumnya minyak atsiri dalam keadaan segar dan murni antara lain tidak berwarna, tidak stabil terhadap pengaruh lingkungan baik pengaruh udara, sinar matahari dan panas, tidak dapat campur dengan air dan larut dalam pelarut organik (Mulyani dan Gunawan 2004).

Penyimpanan lama minyak atsiri dapat teroksidasi dan membentuk resin dan serta warnanya berubah menjadi lebih tua (gelap). Mencegah terjadi

perubahan warna, minyak atsiri harus terlindung dari pengaruh cahaya, misalnya disimpan dalam bejana gelap, bejana tersebut juga diisi sepenuh mungkin sehingga memungkinkan tidak berhubungan langsung dengan oksigen udara, ditutup rapat serta disimpan ditempat yang kering dan sejuk (Gunawan dan Mulyani 2004).

Minyak atsiri merupakan senyawa, yang pada umumnya berujud cairan, yang diperoleh dari bagian tanaman, akar, kulit, batang, daun, buah, biji, maupun dari bunga dengan cara penyulingan. Meskipun kenyataan untuk memperoleh minyak atsiri dapat menggunakan cara lain seperti ekstraksi menggunakan pelarut organik atau dengan cara dipres. (Sastrohamidjojo H 2004).

Minyak atsiri di industri saat ini sering digunakan sebagai zat tambahan dalam sediaan kosmetika, obat, makanan, rokok dan sebagainya. Selain itu minyak atsiri digunakan sebagai obat anti kuman dan kapang.

Sifat fisika kimia minyak atsiri menentukan kualitas minyak atsiri antara lain bobot jenis dan indeks bias minyak atsiri. Indeks bias adalah perbandingan kecepatan cahaya dalam udara dengan kecepatan cahaya dan zat tersebut, dan indek bias berguna untuk identifikasi kemurnian. Salah satu kriteria paling penting dalam menentukan mutu dan kemurnian minyak atsiri adalah bobot jenis (Guenther 1990).

**2. Metode isolasi minyak atsiri dengan metode uap air**

Penyulingan atau destilasi adalah proses pemisahan komponen yang berupa cairan atau padatan dari 2 macam campuran atau lebih berdasarkan perbedaan titik uapnya dan proses ini dilakukan terhadap minyak atsiri yang tidak larut dalam air.

Adapun prinsip dari destilasi ini adalah penguapan dan pengembunan kembali uap tersebut pada suhu titik didih (Guenther 1987).

Destilasi uap air merupakan penyulingan dengan cara pengukusan mirip dengan perebusan akan tetapi, antara bahan baik dari cara perebusan menghasilkan rendemen minyak yang tingginan air dibatasi oleh penyekat, berupa saringan berlubang. Bahan diletakkan diatas penyekat dan air dibawahnya. Metode ini lebih baik dari cara perebusan dan menghasilkan rendemen minyak yang tinggi, mutu lebih baik, proses penguapan lebih cepat sehingga waktu penyulingan lebih pendek (Guenther 1990).

## D. Kromatogtafi Gas – Spektroskopi Massa

Gabungan dari spektrometri massa dan kromatografi gas merupakan metode GC-MS. Metode spektrometri massa yaitu metode yang didasarkan pada pengubahan komponen pencuplikan menjadi ion-ion gas dan memisahkannya berdasarkan perbandingan masa terhadap mutan (m/z) sedangkan pada kromatografi gas merupakan tehnik pemisahan dimana solut-solut yang mudah menguap dan stabil terhadap panas, bermigrasi melalui kolom yang mengandung fase diam dengan tergantung pada kecepatan rasio distribusinya. Pemisahan pada kromatografi gas terjadi ketika sampel diinjeksikan ke dalam fase gerak. Fase gerak yang biasa digunakan adalah gas inert seperti helium, nitrogen, hidrogen, atau campuran argon dan metana. Pemisahan yang terjadi saat elusi didasarkan atas titik didih senyawa dikurangi dengan semua interaksi yang mungkin terjadi antara solut dengan fase diam. Komponen-komponen yang telah terpisah

kemudian menuju detektor. Detektor akan mengubah sinyal gas pembawa dan komponen-komponen di dalamnya menjadi sinyal elektronik dalam bentuk kromatogram. Kromatogram akan memperlihatkan deretan luas puncak terhadap waktu. Waktu tambat tertentu dapat digunakan sebagai data kualitatif, sedangkan luas area dapat digunakan sebagai data kuantitatif. Analisis GC-MS merupakan metode yang cepat dan akurat untuk memisahkan campuran yang rumit, mampu menganalisis campuran dalam jumlah kecil dan menghasilkan data yang berguna mengenai struktur serta identitas senyawa organik (Agusta 2000). Instrumen GC-MS terdiri dari gas pengangkut (*Carrier Gas*), pengatur aliran dan pengatur tekanan, tempat injeksi, kolom serta detektor spectrometer massa (Agusta 2000).

## E. Tinjauan Bakteri

### 1. Klasifikasi

Kingdom : Bakteria

Divisio : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria

Ordo : Enterobacteriales

Familia : Enterobacteriaceae

Genus : *Escherichia*

Spesies : *Esherichia coli*. (Todar 2008)

### 2. Morfologi dan Identifikasi

*Escherichia coli* bakteri gram negatif, bentuk batang, tidak berspora, memiliki flagel, ukuran kecil sampai sedang, konsistensinya halus, tepi rata,

menghasilkan tes positif terhadap indol dan menghasilkan gas dari glukosa, *Escherichia coli* mempunyai morfologi yang khas pada media pembeda seperti media agar EMBA akan menunjukkan warna kemilau *Metalic sheen* dan tes indol positif.

**3. Patogenesis**

Patogenitas *Escherichia coli* menyebabkan penyakit bila resistensi usus melemah, bakteri akan menyerang jaringan dinding usus yang menyebabkan diare pada usus manusia, infeksi saluran kemih, infeksi saluran paru (infeksi nosokomial) dan infeksi kulit. (Jawetz *et al* 2005). *Escherichia coli* banyak ditemukan di dalam usus halus manusia sebagai flora normal, tetapi bila kesehatan menurun, bakteri ini dapat bersifat patogen terutama akibat toksin yang dihasilkan. *Esxherichia coli* umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih berada dalam usus, tetapi dapat menyebabkan penyakit pada saluran kencing, paru-paru, saluran empedu dan saluran otak (Jawetz *et al* 2005).

*Escherichia coli* dapat menyebabkan berbagai penyakit tergantung dari tempat infeksinya, seperti infeksi saluran kemih (ISK) dan diare. Beberapa strain *Escherichia coli* menyebabkan diare yaitu Enterophatogenic *Escherichia coli* (EPEC), Enterotoxigenic *Escherichia coli (ETEC*) merupakan penyebab umum diare pada musafir. Enterohemoragic *Escherichia coli* (EHEC) dihubungkan dengan hemoragic colitis, Enteroinvasif *Escherichia coli* (EIEC) menyebabkan penyakit mirip shigellosis sedangkan Enteroagregatif *Escherichia coli* (EAEC) menyebabkan diare yang akut dan kronis (Juliantina 2009).

**4. Struktur toksin**

*Escherichia coli* mepunyai antigen O, H dan K. (Jawetz *et al* 2005). Antigen O merupakan bagian terluar dinding sel lipopolisakarida dan terdiri dari unit polisakarida. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol dan biasanya dengan dideteksi dengan cara aglutinasi bakteri. Antigen K merupakan bagian luar dari antigen O. Beberapa antigen K adalah polisakarida dan yang lainnya protein. Antigen K pada *Escherichia coli* menyebabkan perlekatan bakteri pada sel epitelial yang memungkinkan invasi ke sistem gastrointestinal. Antigen H merupakan antigen flagella.

## F. Kotrimoksazol

Kotrimoksazol merupakan kombinasi trimetroprim dan sulfametoksazol yang dapat menghambat reaksi enzimatik obligat pada 2 tahap yang berurutan pada mikroba, sehingga kombinasi kedua obat memberikan efek sinergi. Kotrimoksazol digunakan sebagai kontrol positif. Penemuan sediaan kombinasi ini merupakan kemajuan penting dalam usaha meningkatkan efektifitas klinik antimikroba (Ganiswarna 1995).

Mikroba yang peka terhadap kombinasi trimetripin-sulfametoksazol salah satunya adalah *Escherichia coli*. Kedua komponen memperlihatkan interaksi sinergik walaupun mikroba telah resisten terhadap sulfonamide dan agak resisten terhadap trimetropin, kombinasi ini mungkin efektif. Sinergisme maksimum terjadi bila mikroba peka terhadap kedua komponen. Frekwensi terjadinya resisten terhadap kontrimoksazol lebil rendah dan pada masing-masing obat karena

mikroba yang resisten terhadap salah satu komponen lebih peka terhadap komponen lainnya. Resistensi *Escherichia coli* terhadap trimetropin ditentukan oleh gen kromosom bulat plasmid. Resisten terhadap bentuk kombinasi terjadi juga pada in vivo. Prevalensi resistensi *Escherichia coli* terhadap kotrimoksazol meningkat pada saat diberi pengobatan dengan sediaan kombinasi tersebut (Ganiswara 1995).

## G. Kombinasi obat

Menurut (Siswandono dan Soekardjo, 2000) Campuran dua atau lebih obat dalam satu formulasi, penggunaan obat dalam formulasi yang berbeda dan diminum bersama-sama atau dua obat yang diminum dalam waktu yang berbeda dan kemudian bersama-sama didalam darah adalah pengertian kombinasi obat. Dalam penggunaan kombinasi obat dapat menimbulkan interaksi, sehingga kemungkinan akan terjadi peningkatan maupun penurunan dari efek obat.

Efek kombinasi dari beberapa agen kimia yang berbeda terdapat 3 jenis interaksi antara dua agen kimia yaitu aditif, sinergis dan antagonis. Efek aditif adalah ketika dua agen dengan kerja yang serupa diberikan, interaksinya disebut efek aditif. Ini adalah jumlah dari efek kedua agen, dan dapat menjadi diinginkan atau tidak diinginkan. Efek antagonis adalah jika dua agen (obat) dikombinasikan yang mempunyai efek atau kerja yang berlawanan, maka efek obat-obat itu akan saling meniadakan dan kerja dari kedua obat itu akan hilang (Kee dan Hayes 1994).

## H. Media

Media adalah bahan yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme di atas atau di dalamnya, terdiri atas zat-zat kimia organik atau anorgabik yang telah mengalami pengolahan tertentu dapat untuk mengembangbiakkan mikroba. Mikroorganisme sebagai makhluk hidup mempunyai kebutuhan dasar yang sama yaitu meliputi air, karbon, energi, mineral dan faktor tumbuh. Keasamaan (pH) media juga amat penting bagi pertumbuhan organisme terutama kerja enzim yang sangat dipengaruhi oleh pH. Sebagian besar bakteri tumbuh paling baik pada pH sekitar 7.

Bentuk media ada tiga jenis yaitu: media padat, media cair, dan media semi padat atau semi cair. Media berfungsi sebagai menumbuhkan atau pengembangbiakan mikroba, mengisolasi mikroba, fermentasi, dan pada media uji padat digunakan untuk mengamati penampilan atau morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni, media semi padat digunakan untuk menguji ada tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi (Hadioetomo 1985).

## I. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji Aktivitas antibakteri pada penelitian ini diukur untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), serta mengetahui potensi paling efektif dari masing-masing konsentrasi. Prinsip dari penelitian ini adalah dilakukan pengenceran zat yang diuji dengan berbagai konsentrasi dan dilakukan pembenihan dengan cara bahan uji yang akan diperiksa ditambahkan dengan bakteri yang sudah diencerkan ke dalam media yang akan digunakan. Suatu

antibakteri dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi apabila KHM dan KBM terjadi pada kadar obat yang rendah tetapi mempunyai daya bunuh atau daya hambat yang besar pada pertumbuhan bakteri. Metode yang umum digunakan untuk menguji daya antibakteri diantaranya:

**1. Metode difusi**

**1.1 Metode lubang (perforasi)**. Bakteri uji yang umurnya 18-24 jam disuspensikan ke dalam media agar pada suhu sekitar 45º C. Suspensi bakteri dituangkan ke dalam cawan petri steril. Setelah agar memadat, dibuat lubang-lubang dengan diameter 6-8 mm. Kedalam lubang tersebut dimasukkan larutan zat yang akan diuji aktivitasnya sebanyak 20µL, kemudian diinkubasikan pada suhu 37º C selama 18-24 jam. Aktivitas antibakteri dapat dilihat dari daerah bening yang mengelilingi lubang perforasi.

**1.2. Metode cakram kertas.** Zat yang akan diuji diserapkan ke dalam cakram kertas dengan cara meneteskan pada cakram kertas kosong larutan antibakteri sejumlah tertentu dengan kadar tertentu pula. Cakram kertas diletakkan diatas permukaan agar padat yang telah diolesi bakteri, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37º C. Aktivitas antibakteri dapat dilihat dari daerah hambat di sekeliling cakram kertas.

**2. Metode Dilusi**

**2.1. Metode pengenceran tabung.** Antibakteri disuspensikan dalam agar *Triptic Soy Broth* (TSB) dengan pH 7,2-7,4 kemudian dilakukan pengenceran dengan menggunakan beberapa tabung reaksi. Selanjutnya dilakukan inokulasi bakteri uji yang telah disuspensikan dengan NaCl fisiologis steril atau dengan TSB, yang tiap mililiternya mengandung kurang lebih 105-106 bakteri. Setelah

diinkubasikan pada suhu 37º C selama 18-24 jam, tabung yang keruh menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan tabung yang bening menunjukkan zat antibakteri yang bekerja.

**2.2. Metode pengenceran agar.** Zat antibakteri dicampur sampai homogen pada agar steril yang masih cair dengan suhu terendah mungkin (±45º C) dengan menggunakan berbagai 32 konsentrasi aktif, larutan tersebut dituangkan ke dalam cawan petri steril kemudian setelah memadat dioleskan bakteri uji pada permukaannya (Yuliani 2001).

## J. Landasan Teori

Banyak dilakukan penelitian tentang kemampuan ekstrak maupun minyak atsiri tumbuhan sebagai agen antibakteri (Ramesh & Satakopan 2010). Komponen senyawa minyak atsiri daun kemangi dengan metode destilasi uap adalah linalool, estragol, metil sinamat, sineol, isokariofllen, dan kubeben (Kadinan *dkk* 2007).

Beberapa golongan kandungan kimia tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Sifat dari penghambatan ini disebut sebagai bakteriostatik atau bakteriosida (Hadipoentyanti dan Wahyuni 2008). Daun kemangi merupakan tanaman herbal yang dapat digunakan sebagai antibakteri. Bahan aktif pada daun kemangi yang berperan sebagai antibakteri adalah kandungan senyawa dari minyak astiri yaitu 1,8-cineole, ß-Bisabolene,methyl eugenol. Ketiga bahan tersebut memiliki sifat larut terhadap etanol dan dapat menyebabkan kerusakan membran sel bakteri. Membran sel berfungsi untuk permeabilitas selektif dan proses transpor aktif sehingga mampu menjaga komposisi internal dalam bakteri.

Apabila membran sel rusak maka protein dan lipid dalam bakteri akan keluar dan bahan makanan untuk menghasilkan energi tidak dapat masuk sehingga mengakibat kematian bakteri (Dzen *et al* 2003)

Penelitian telah banyak dilakukan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dari berbagai tamanaman. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Sutiyami dan Nuryani 2014 tentang uji aktivitas minyak atsiri kemangi *(Ocinum sanctum* L.*)* pada berbagai kuman diare. Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri kemangi mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri diare. Pada penelitian tersebut didapatkan hasil aktivitas minyak atsiri kemangi *(Ocinum sanctum L.)* terhadap bakteri *Escherichia coli* mampu menghambat pada konsentasi 20% dengan diameter 6,5 mm.

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) digunakan untuk meredakan radang tenggorokan, demam, bau badan, perawatan kulit, rambut rontok, ketombe dan menghindari kegemukan (Sarwono 2003), serta memiliki efek antimikroba baik terhadap bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif (Onyeagba *et al* 2004). Senyawa yang dihasilkan minyak atsiri daun jeruk nipis antara lain *limonen, β pinen, sabinen, (E)-β–Ocimene, α-pinen, myrcene, linalool, geranial, neral, citronellol, geranilasetat, nerilasetat, geraniol,*dan *nerol* (Lota *dkk.* 2002).

Penelitian yang dilakukan Reddy *et al* tentang ujian anti bakteri dan antioksidan minyak atsiri daun jeruk nipis terhadap bakteri *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Enterobacterfaecalis, Salmonella paratyphi, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa,* dan *Serratiamarcescens.* Penelitian tersebut didapat hasil bahwa minyak atsiri daun jeruk nipis mampu

menghambat *Escherichia coli* dengan konsentrasi 20%, 10%, 5%, dan 1% yang masing-masing konsentrasi membentuk diameter zona hambat 33 mm, 30 mm, 27 mm, 22 mm (Reddy dkk 2012). Sifat dari penghambatan ini disebut sebagai bakteriostatik atau bakteriosida (Hadipoentyanti dan Wahyuni 2008). Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa masing-masing daun kemangi dan daun jeruk nipis mempunyai aktivitas antibakteri, sehingga kombinasi keduanya akan memberikan aktivitas yang lebih besar yang dihasilkan dari efek kumulatif dari daun kemangi dan daun jeruk nipis

Bakteri *Escherichia coli* menyebabkan penyakit bila resistensi usus melemah, bakteri akan menyerang jaringan dinding usus yang menyebabkan diare pada usus manusia, infeksi saluran kemih, infeksi saluran paru (infeksi nosokomial) dan infeksi kulit. (Jawetz *et al* 2005). Diare penyebab utama kematian pada balita. Studi Mortalitas dan Riset Kesehatan Dasar dari tahun ke tahun diketahui bahwa diare masih menjadi penyebab utama kematian balita di Indonesia (Jane S. 2011). Banyak pengobatan menggunakan antibiotik menimbul masalah baru yaitu resintensi sehingga diperlukan pengobatan dengan alternatif lain. Berdasarkan hal tersebut, maka diperlukan alternatif pengobatan secara tradisional untuk menggantikan antibiotik dengan menggunakan tanaman obat tradisional.

Daun kemangi dan daun jeruk nipis masing-masing mempunyai aktivitas terhadap bakteri dan belum memperoleh keterangan kombinasi minyak atsiri dari kedua bahan tersebut, dengan cara pekombinasian kedua minyak atsiri ini diharapkan untuk memperoleh efek yang lebih efektif dibandingkan bentuk

tunggalnya sebagai antibakteri. Efek kombinasi dari beberapa senyawa dari kedua agen kimia dapat terjadi interaksi dengan melihat hubungan dosis efek linier yaitu adiktif, sinergis dan antagonis sehingga masing-masing interaksi memberikan efek kombinasi baik tetap, lebih besar atau lebih kecil dari efek setiap masing-masing individu kedua agen kimia tersebut (Alatas dan Nurhayati 2006).

Minyak atsiri yang digunakan adalah hasil metode uap-air. Metode ini lebih baik dari cara perebusan dan menghasilkan rendemen minyak yang tinggi, mutu lebih baik, proses penguapan lebih cepat sehingga waktu penyulingan lebih pendek (Guenther 1990). Identifikasi komponen kimia minyak atsiri dilakukan dengan analisis GC-MS.

Metode uji aktivitas antibakteri digunakan metode difusi dan dilusi. Zona diameter hambat yang diperoleh pada metode difusi dasar penggunaannya adalah terbentuk atau tidaknya zona hambatan pertumbuhan bakteri di sekeliling cakram atau silinder yag berisi zat anti mikroba (Harminta 2004). Kadar minimum yaitu kadar obat terendah yang dapat membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri pada metode dilusi. Metode dilusi cair, masing-masing konsentrasi ditambah suspensi bakteri dalam media sedangkan metode dilusi padat, tiap konsentrasi zat uji dicampur media agar, lalu ditanami bakteri, sehingga dapat ditentukan dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Oleh karena itu, dilakukan penelitian dengan penentuan konsentrasi dan mengetahui potensi paling efektif dari masing-masing konsentrasi. Suatu antibakteri dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi apabila KBM terjadi pada kadar obat yang rendah tetapi mempunyai daya bunuh atau daya hambat yang besar pada pertumbuhan bakteri dalam media uji.

## K. Hipotesis

Pertama, kombinasi (1:3) dari minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, perbandingan kombinasi (1:1, 1:2, 1;3, 2:1, 3:1) minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mempunyai aktivitas antibakteri yang paling efektif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimun (KBM) dapat ditentukan dari kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

# BAB III

# METODE PENELITIAN

## A. Populasi dan Sampel

### 1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan daun jeruk nipis *(Citrus aurantifolia)* yang diperoleh dari B2P2TOOT Tawangmangu, Kabupaten karanganyar, Jawa Tengah pada bulan November 2015.

### 2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi dan daun jeruk nipis yang diambil secara acak dari populasi yang ada di daerah B2P2TOOT Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun kemangi adalah daun yang diambil berwarna hijau, bersih, bebas dari penyakit, bagian daun muda maupun tua. Daun jeruk nipis yang dipilih dengan mengambil daun yang berwarna hijau, masih segar, tidak berpenyakit, bagian daun yang masih muda maupun tua.

## B. Variabel Penelitian

### 1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah kombinasi minyak atsiri daun kemangi *(Ocimun basilicum* L.) dan daun jeruk nipis *(citrus aurantifolia)* terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 yang didapat dengan metode

destilasi uap air. Variabel utama kedua adalah uji aktivitas hasil dan kombinasi minyak atsiri daun kemangi *(Ocimun basilicum* L.) dan daun jeruk nipis *(citrus aurantifolia)* terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922.

**2. Klasifikasi variabel utama**

Variabel utama yang telah diidentifikasikan terdahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas yang dimaksud dalam penelitian ini adalah kombinasi minyak atsiri daun kemangi *(Ocimun basilicum* L.*)* dan daun jeruk nipis *(citrus aurantifolia).*

Variabel terkendali dalam penelitian ini merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu diperhatikan atau ditetapkan kualitasnya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah kondisi laboratorium meliputi kondisi inkas, alat dan bahan yang digunakan harus steril, dan media yang digunakan dalam penelitian adalah Endo Agar (EA) dan Braint Heart Infusion (BHI) juga harus steril.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dan pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang dipengaruhi oleh minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis berdasarkan pertumbuhan bakteri pada media uji.

**3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, daun kemangi adalah daun dari tanaman kemangi yang berwarna hijau, masih segar, bersih, bebas dari penyakit, bagian daun mudan maupun tua yang diambil didaerah B2P2TOOT Tawangmangu, Kabupaten Karangayar, Jawa Tengah.

Kedua, daun jeruk nipis adalah daun dari tanaman jeruk nipis yang berwarna hijau, masih segar, bersih, tidak berpenyakit, bagian daun muda maupun tua yang diambil dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Ketiga, minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis dalam penelitian ini adalah minyak atsiri hasil destilasi daun kemangi dan daun jeruk nipis dengan metode destilasi uap air.

Keempat, bakteri yang digunakan dalam penelitian, yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Kelima, dalam penelitian ini adalah uji aktivitas dengan metode difusi dengan melihat dameter zona hambat hambat yang terbentuk pada media uji sehingga dapat diukur.

Keenam, diameter daya hambat adalah pertumbuhan bakteri uji dengan mengukur diameter zona bening disekitar sumuran pada media uji dengan dilakukan beberapa satu seri pengenceran dalam berbagai kombinasi yaitu 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, kontrol negatif (-); kontrol (+).

Ketujuh, kombinasi yaitu 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, adalah uji aktivitas antibakteri secara difusi dengan beberapa perbandingan kombinasi untuk mengukur diameter zona hambat pada media uji

Kedelapan, uji aktivitas dengan metode dilusi adalah pengujan aktivitas dengan melihat taraf kekeruhan dalam media uji yaitu berupa satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 100%, 50%, 20%; 12,5; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; kontrol negatif (-); kontrol (+).

Kesembilan, Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri dengan melihat pertumbuhan bakteri pada medium.

## C. Bahan dan Alat

### 1. Bahan dan Sampel

Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun kemangi dan daun jeruk nipis adalah daun yang berwarna hijau, bersih, bebas dari penyakit, bagian daun muda maupun tua yang diambil dari B2P2TOOT Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Bakteri yang akan di uji pada penelitian ini adalah *Escherichie coli* ATCC 25922 yang diperoleh dari pembiakan sendiri di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium *Nutrient Agar (NA), Braint Heart Infusion (BHI), Endo agar (EA), Sulfida Indol Motility (SIM), Kligler Iron Agar (KIA), Lysine Iron Agar (LIA), Citrat.*

Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquades, NaCl fisiologis, $Na_2SO_4$ anhidrat, DMSO, larutan standart Mc Farlan, toluen, etil asetat, anisaldehida-asam sulfat,

**2. Alat**

Alat yang digunakan untuk mendapatkan minyak atsiri daun kemangi *(Ocimun basilicum* L.*)* dan daun jeruk nipis *(citrus aurantiflia)* dalam penelitian ini meliputi tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, ose platina, inkas, timbangan, pipet tetes, pipet volume 1 ml dan 0,5 ml, siring, inkubator, refraktometer, pinset, kapas, bunsen, corong kaca, corong pisah, oven, GC-MS (Shimadzu, jenispengion EI (Electron Impact) dan seperangkat alat destilasi.

## D. Jalannya Penelitian

**1. Identifikasi tanaman**

Tahap penelitian ini pengambilan daun kemangi *(Ocimun basilicum L.)* dan daun jeruk nipis *(citrus aurantifolia)* adalah daun yang berwarna hijau, bersih, bebas dari penyakit yang diambil dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Tahap pertama dilakukan dalam penelitian ini adalah determinasi tanaman, bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel daun kemangi dan daun jeruk nipis yang berkaitan dengan ciri-ciri makroskofis dan mencocokan morfologi yang ada pada tanaman yang dibuktikan di Labolatorium Universitas Setia Budi Surakarta.

**2. Pengambilan sampel**

Daun kemangi adalah daun yang berwarna hijau, bersih, bebas dari penyakit, diambil secara acak dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun jeruk nipis adalah daun yang berwarna hijau, bersih, bebas dari penyakit diambil secara acak dari Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Daun kemangi dan daun jeruk nipis digunakan dalam keadaan segar

tanpa pengeringan untuk menghasilkan minyak atsiri yang lebih maksimal karena jika dikeringkan menyebabkan minyak atsiri dalam daun menguap.

**3. Isolasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis**

Daun kemangi dan daun jeruk nipis yang masih segar sudah dipanen dikumpulkan dan ditimbang, dicuci bersih dengan air mengalir agar terbebas dari debu dan pengotor lain. Daun dirajang lalu dilakukan destilasi uap air sampai dihasilkan tetesan minyak atsiri dari daun kemangi dan daun jeruk nipis hingga tidak meneteskan lagi. Minyak atsiri yang terapung dipisahkan dari air dengan ditambahkan $Na_2SO_4$ anhidrat. Minyak atsiri yang diperoleh disimpan dibotol yang tertutup rapat dan terlindung dari cahaya. Hasil minyak atsiri yang diperoleh digunakan sebagai sampel untuk proses selanjutnya.

**4. Pemeriksaan organoleptis minyak atsiri daun Kemangi dan daun Jeruk nipis**

Dari hasil destilasi masing-masing sampel minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis, diambil dengan volume yang sama dan ditempatkan diwadah kaca yang bersih dan jernih. Kemudian, amati dan bandingkan meliputi pemeriksaan bentuk, warna, aroma dan rasa.

**5. Kromatografi Gas-Spektrometer Massa (GC-MS)**

Analisis komponen minyak atsiri dilakukan dengan menggunakan GC-MS dengan kondisi alat GC-MS sebagai berikut :

Jenis pengion EI (*Electron Impact*) , gas pembawa yaitu Helium 14,0 Kpa, jenis kolom HP-5MS, panjang kolom 30 meter, diameter kolom 0,25 mm, suhu kolom 60 – 290º C, suhu injektor 290º C, suhu detector 250º C, kecepatan kenaikan suhu 5º C / menit

**6. Penetapan indeks bias minyak atsiri**

Pemeriksaan indeks bias, minyak atsiri dari daun kemangi dan daun jeruk nipis diperiksa indeks bias dengan satu kali pengulangan menggunakan refraktmeter ABBE dengan cara sebagai berikut: Badan prisma dibuka dan dibersihkan dengan kapas yang sudah dibasahi dengan alkohol. Mengatur refraktometer sehingga garis dan skala nampak jelas, mencatat temperature ruang tempat bekerja dan kemudian meneteskan cairan yang diukur pada prisma dan menutup kembali. Pemutar sebelah kanan diputar sehingga batas gelap dan terang tepat pada satu garis silang kemudian membaca skala dan mencatat sebagai indeks bias.

**7. Penetapan bobot jenis minyak atsiri**

Botol kosong ditimbang, kemudian masukkan 1 ml minyak atsiri ke dalam botol timbang. Menimbang minyak atsiri dan botol timbang dengan teliti dan akurat. Kemudian hitunglah bobot minyak atsiri tersebut dengan bobot air pada suhu dan volume yang sama.

**8. Sterilisasi alat dan bahan**

Media agar yang digunakan dalam penelitian disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121º C selama 15 menit, medium tersebut lebih efektif sterilisasi dengan uap panas. Alat –alat yang terbuat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170º C selama 2 jam. Alat-alat seperti ose disterilkan dengan cara dipijar atau dipanaskan langsung. Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin.

**9. Identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25292 dengan media selektif**

Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli,* suspensi bakteri uji *Escherichia coli* dilakukan inokulasi pada media *Endo Agar (EA)* yang diinkubasi pada suhu 37º C selama 24-48 jam. Hasil positif dikatakan bila terjadi penampakan koloni merah dengan logam kilau yang permanen dan warna medium merah violet (Volk dan Wheller 1988).

**10. Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Escherichia coli.* Gram negatif didapatkan bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacilli berate positif golongan *Escherichia coli.* Pewarnaan gram dilakukan dengan cara dibuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian tetes Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada kedua preparat sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan ± 1 menit. Kemudian, cuci dengan aquadest mengalir dan ditetesi mordant (*lugol, s iodine*/ Gram B) didiamkan selama ± 1 menit kemudian dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol) selama 30 detik. Tetes counterstain (safari/ Gram D) dan didiamkan selama ± 45 detik, cuci dengan aquadest mengalir dan keringkan, preparat dengan kertas tissue yangditempelkan disisi ulasan kemudian didiamkan sampai mongering diudara (Volk dan Wheller 1988).

**11. Identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dilakukan berdasarkan uji biokimia**

Pertama, uji biokimia pada media SIM (*Sulfida Indol Motility)* berfungsi untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas bakteri, sulfide positif dengan media warna hitam. Uji indol positif jika terbentuk cincin warna merah setelah ditambahkan reagen erlich. Uji positif jika terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

Kedua, Media KIA (*Kliger's Iron Agar*) berfungsi untuk uji fermentasi karbohidrat (glukosa, laktosa) dan sulfida, hasil pada bagian lereng dan dasar dapat berwarna merah yang berarti basa (ditulis k) atau kuning yang berarti suasana asam (ditulis A). Terbentuk gas ditandai dengan pecahnya media (ditulis G+), sulfida positif terbentuk warna hitam pada media ditulis (S+).

Ketiga, Media LIA (*Lysine Iron Agar*) berfungsi untuk menguji deaminasi dan dekarboksilasi lisin, pada lereng dan dasar media serta adanya sulfida. Pada bagian lereng dan dasar terdapat hasil warna merah coklat (ditulis R) atau berwarna kuning yang berarti suasananya asam (ditulis A) terbentuk warna hitam pada media berarti sulfida positif (ditulis R+).

Keempat, Media *Citrat* berfungsi untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal, berwarna hijau.

Kelima, Bakteri uji pada masing-masing media uji, diinokulasi secara tusukan pada media SIM, goresan dan tusukan pada media KIA dan LIA, goresan pada media citrat, kemudian diinkubasi pada suhu 37$^{o}$C selama 24 jam (Jawetz *et al* 1986).

**12. Pembuatan suspensi bakteri**

Bakteri uji *Escherichia coli* dalam biakan murni pada media *Nutrient Agar (NA)* diambil masing-masing satu ose kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang telah diisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) cair sebanyak 5 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam. Selanjutnya Pada metode difusi hasil suspensi bakteri dapat digunakan langsung setelah didapat kekeruhan standar Mc farlan. Kemudian untuk metode dilusi dipipet sebanyak 0,01 ml dimasukkan dalam 10 ml BHI dengan pengenceran 1:1000 sehingga didapat kekeruhan yang sama dengan standard Mc Farlan (Jawez *et al* 2005).

**13. Pengujian aktivitas bakteri dengan metode Difusi**

Hasil destilasi dengan uap air minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis didapatkan diuji secara mikrobiologi dengan bakteri uji *Escherichia coli*. Metode difusi, pertama menggunakan 2 cawan petri dilakukan dengan aseptis yaitu bakteri uji diambil dari media BHI dengan menggunakan lidi yang dibaluti kapas, kemudian oleskan secara merata kedalam cawan petri berisi media MHA. Kemudian, pada cawan petri yang pertama yang sudah dibagi 3 bagian diletakkan kertas cakram yang sudah dicelupkan berisi masing-masing sampel yaitu minyak atsiri kemangi, minyak atsiri jeruk nipis dan kontrol positif kotrimoksazol. Pada cawan petri yang kedua dibagi menjadi 5 bagian, sampel menggunakan minyak atsiri kemangi dan jeruk nipis kombinasi 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1. Pada cawan petri diletakkan kertas cakram yang sudah dicelupkan berisi sampel yaitu kombinasi 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1. Semua cakram sudah diletakkan di cawan petri diinkubasi

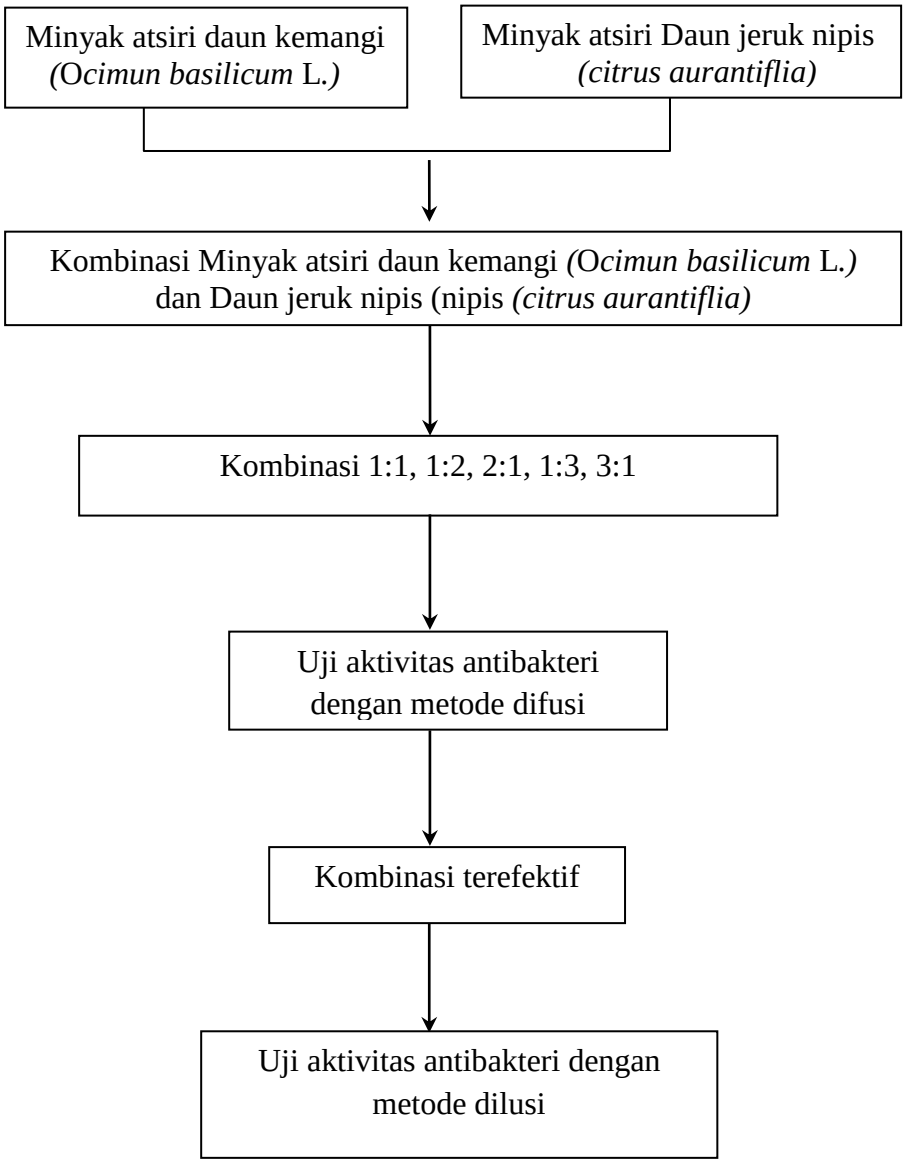
kedalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37º C. Uji aktivitas ini dilakukan pengulangan 3 kali. Kemudian dilakukan pengamatan, zona hambat yang terbentuk dapat diukur pada daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar sumuran, menandakan bahwa minyak atsiri hasil destilasi daun kemangi dan jeruk nipis memiliki daya hambat terhadap bakteri uji.

**14. Pengujian aktivitas bakteri dengan metode Dilusi**

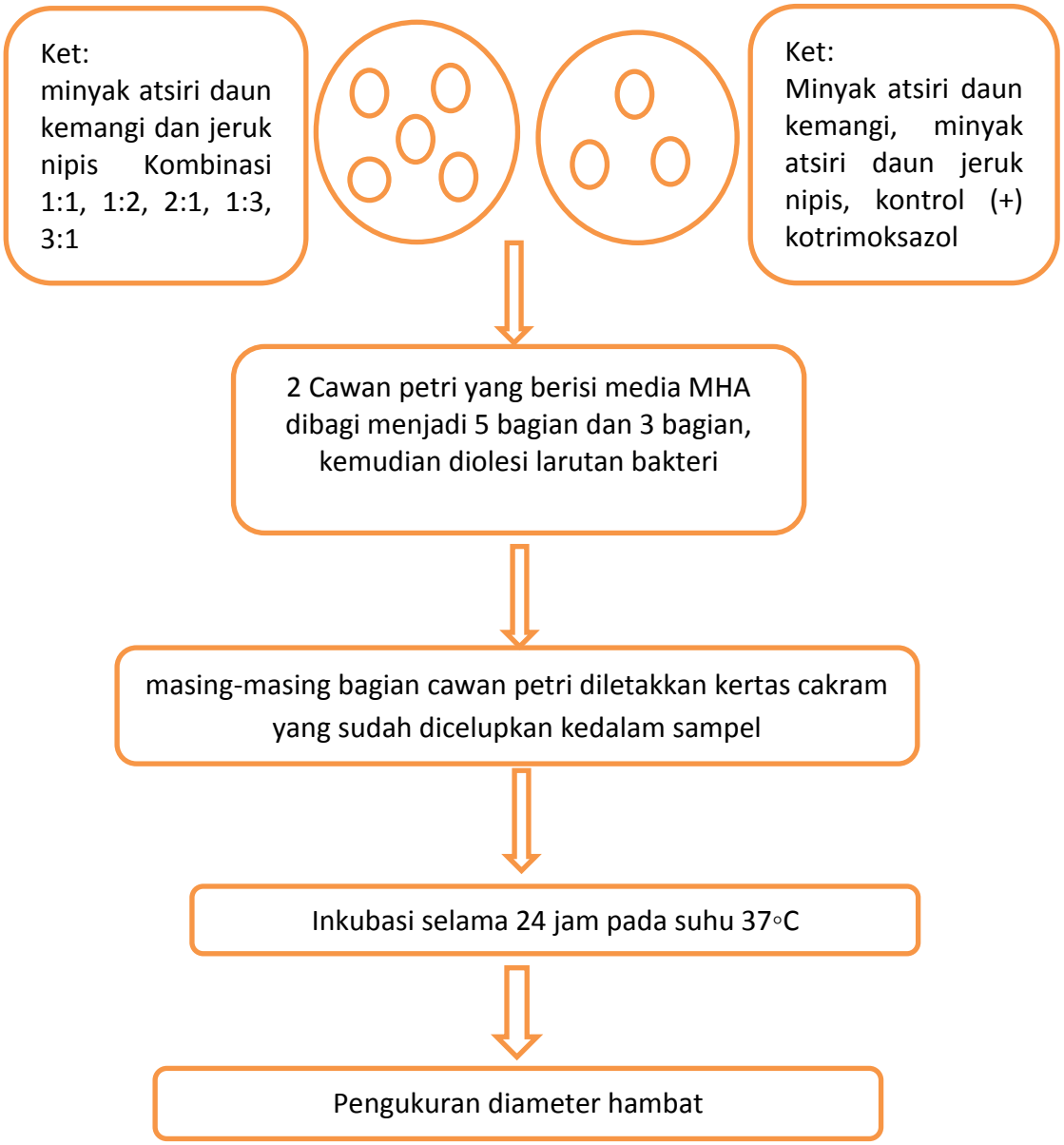
Metode dilusi digunakan untuk mengetahui Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung yang terdiri dari 12 tabung dengan konsentrasi 100%, 50%, 20%; 12,5; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19% kontrol positif (+), kontrol negatif (-). pada tabung kedua berisi konsentrasi 100% diteteskan secukupnya tween 80 untuk pengenceran larutan minyak atsiri. Masukkan 0,5 ml media BHI dari tabung 2 sampai 12 secara aseptik, tabung 1 kontrol (-) dimasukan 1,0 ml larutan stock, kemudian ke dalam tabung 2 dimasukan 0,5 ml larutan stock, dari tabung 2 dipipet 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 3 begitu seterusnya sampai tabung 11. Tambahkan 0,5 ml biakan yang akan diperiksa dan telah diencerkan 1:1000 dari biakan yang telah dieramkan dari tabung 2 sampai tabung 12. Tabung terakhir berlaku sebagai kontrol positif (+). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan menggoreskan larutan dari sejumlah tabung yang hasilnya jernih pada medium selektif kemudian diinkubasi 37ºC selama 24 jam, kemudian diamati. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dari goresan bakteri yang sudah tidak terdapat pertumbuhan bakteri.

**15. Analisis Hasil**

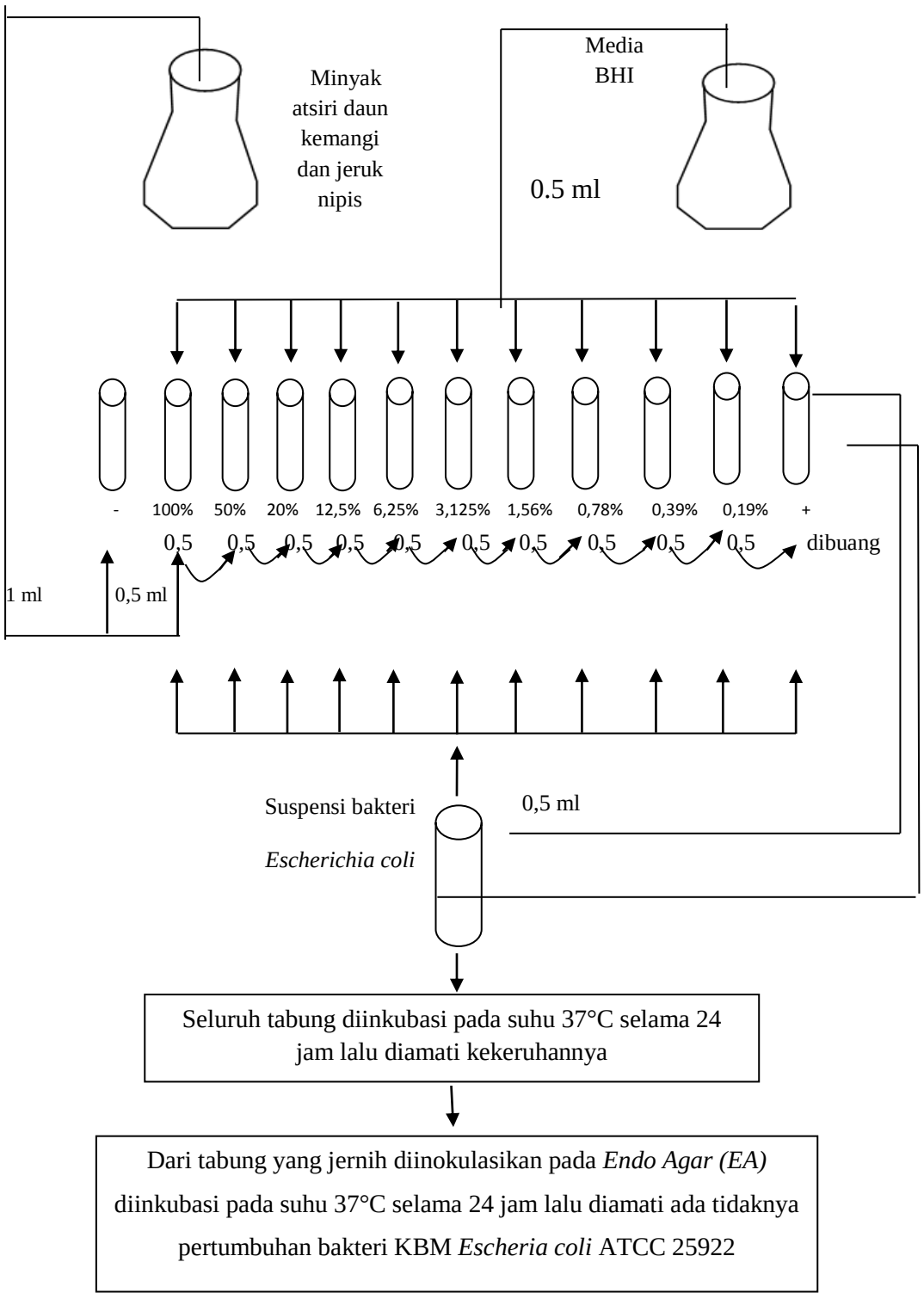
Analisis hasil yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan membandingkan hasil diameter daya hambat kombinasi (1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1) dari minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 digunakan uji ANOVA 1 jalan jika data tersebut normal digunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann whitney jika data tidak terdistribusi normal. Hasil kombinasi dengan diameter terbesar dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi untuk mengetahui konsentrasi bunuh minimal.




**Gambar 3. Skema alur pembuatan minyak atsiri Daun kemangi *(Ocimun basilicum* L.*)* dan jeruk nipis *(citrus aurantifolia)* dengan metode destilasi uap air**




**Gambar 4. Skema pengujian aktivitas antibakteri destilasi kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode difusi**




**Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan jeruk nipis dengan konsentrasi 100%, 50%, 20%; 12,5; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19% kontrol positif (+); kontrol negatif (-) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan metode dilusi**

# BAB IV

# HASIL DAN PEMBAHASAN

## 1. Identifikasi tanaman

Determinasi pada penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Gadjah Mada. Determinasi tanaman ini dimaksudkan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang diambil, menghindari tercampurnya bahan sampel dengan bahan lain. Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan daun jeruk nipis *(Citrus aurantifolia).* Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

## 2. Pengambilan bahan

Daun yang digunakan berasal dari tanaman kemangi dan jeruk nipis yang diambil secara acak diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten karanganyar, Jawa Tengah pada bulan November 2015. Daun kemangi dan daun jeruk nipis dicuci bersih dengan air mengalir untuk menghilangkan debu dan kotoran yang menempel pada daun, kemudian ditiriskan.

## 3. Hasil isolasi minyak atsiri daun kemangi dan jeruk nipis

Hasil isolasi minyak atsiri dilakukan menggunakan alat destilasi uap air, sebanyak 5000 gram berat daun yang masih segar setelah dicuci dilakukan perajangan berguna untuk membebaskan minyak atsiri yang terdapat dijaringan tanaman. Minyak atsiri pada bahan dikelilingi oleh kelenjar minyak, pembuluh dan kantung minyak. Bahan dimasukkan ke dalam wadah, diletakkan diatas

penyekat dan air dibawahnya. Metode ini lebih baik dari cara perebusan karena menghasilkan rendemen minyak yang tinggi, mutu lebih baik dan proses penguapan lebih cepat sehinga waktu penyulingan lebih pendek (Guenther 1990). Kemudian dilakukan destilasi uap air selama 6 jam atau lebih sampai minyak atsiri tidak menetes lagi. Minyak atsiri ditampung dan dipisahkan dari air dengan $Na_2SO_4$ anhidrat. Minyak atsiri yang diperoleh disimpan dibotol yang tertutup rapat dan terlindung dari cahaya. Hasil isolasi dapat dilihat pada table 1. Perhitungan rendemen minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis dapat dilihat dilampiran 2.

**Tabel 1. Kadar minyak atsiri**

| Sampel | Bobot sampel (gram) | Volume minyak (ml) | Rendemen (%) |
|---|---|---|---|
| **Kemangi** | 5000 | 10 | 0,2 |
| **Jeruk nipis** | 5000 | 9,6 | 0,19 |

Berdasarkan data yang dihasilkan rata-rata hasil prosentase rendemen minyak atsiri daun kemangi adalah 0.2% dengan bobot sampel 5000 gram dan volume minyak yang dihasilkan 10,0. Hasil prosentase rendemen minyak atsiri daun jeruk nipis adalah 0,19% dengan bobot sampel 5000 gram dan volume minyak atsiri dihasilkan 9,6%. Hasil rendemen kemangi lebih besar karena volume minyak yang dihasilkan juga besar yaitu 10,0 dibandingkan hasil volume minyak atsiri jeruk nipis membuktikan kandungan minyak atsiri kemangi lebih besar berdasarkan hasil uji masing-masing rendemen sampel minyak atsiri.

**4. Hasil organoleptis minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis**

Uji organoleptis serbuk daun kemangi dan daun jeruk nipis meliputi: bentuk, warna, bau dan rasa. Hasil organoleptis dari penelitian minyak atsiri daun

kemangi adalah bentuk minyak, warna kuning, berbau pahit, rasa pahit. Hasil uji organoleptis pada penelitian ini dapat dilihat pada tabel 2 dan 3.

**Tabel 2. Hasil uji organoleptis minyak atsiri daun kemangi (*Ocinum basilicum L.)***

| Pengujian | Hasil penelitian | Pustaka ( Anonim 1979 ) |
|---|---|---|
| **Bentuk** | Cair | cair |
| **Warna** | Kuning | kuning |
| **Bau** | Harum | Harum |
| **Rasa** | Pahit | Pahit |

**Tabel 3. Hasil uji organoleptis minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)**

| Pengujian | Hasil penelitian | Pustaka (Anonim 1979 ) |
|---|---|---|
| **Bentuk** | Cair, kuning pucat | Cair, kuning pucat |
| **Warna** | Kuning pucat | Kuning pucat |
| **Bau** | khas | Khas |
| **Rasa** | Pedas, agak pahit | Pedas, agak pahit |

Hasil organoleptis dari penelitian minyak atsiri daun kemangi adalah bentuk cair, kuning pucat, warna kuning kehijauan, berbau khas, rasa pedas, agak pahit.

## 5. Hasil kromatografi gas-spektropotometri massa (GCMS)

Hasil identifikasi dari minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis menggunakan GC-MS dilakukan untuk mengetahui komponen-komponen yang terkandung didalam minyak atsiri. Hasil identifikasi komponen dengan GCMS dapat dilihat pada tabel 4 dan 5 serta lampiran 19 dan 20

**Tabel 4. Hasil identifikasi komponen minyak atsiri daun kemangi**

| No | Peak | Constituen | R.time (mins) | BM | Kadar (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 1 | 6- Methyl-5 hepten 2-one | 11.399 | 126 | 2.04 |
| **2** | 3 | Linalool | 15.829 | 136 | 3.54 |
| **3** | 9 | z-citral | 20.387 | 134 | 32.79 |
| **4** | 10 | geraldehyde | 21.418 | 137 | 43.43 |
| **5** | 11 | eugenol | 25.768 | 164 | 1,29 |
| **6** | 13 | beta-carhyopillene | 27.317 | 204 | 2.39 |
| **7** | 16 | germamecrene | 27.317 | 204 | 1.51 |
| **8** | 17 | alfa-caryophyllene | 28.829 | 204 | 2.64 |

Berdasarkan hasil data pada tabel 4 menunjukkan bahwa di dalam minyak atsiri daun kemangi yang diidentifikasi terdapat 8 komponen senyawa yaitu 5-Methyl-5 hepten 2-one, Linalool, z-citral, geraldehyde, eugenol, beta-carhyopillene, germamecrene, alfa-caryophyllene. Hasil data tersebut menunjukkan komponen peak memiliki indeks kemiripan dengan senyawa yang sesuai dengan referensi minyak atsiri kemangi yaitu geraldehyde, z-citral, linalool, eugenol. Komponen senyawa hasil identifikasi minyak atsiri daun kemangi adalah komponen utama senyawa minyak atsiri yang paling besar dan berpotensi sebagai aktivitas antibakteri.

**Tabel 5. Hasil identifikasi komponen minyak atsiri daun jeruk nipis**

| Peak | Constituen | R.time (mins) | BM | Kadar (%) |
|---|---|---|---|---|
| **1** | Methyl heptenone | 7.305 | 126 | 1.38 |
| **2** | Limonene | 9.117 | 136 | 11.36 |
| **3** | Cis-citral | 15.581 | 134 | 32.03 |
| **4** | Citral b | 16.497 | 137 | 53.12 |
| **5** | Geranyl Acetate | 19.683 | 164 | 2.10 |

Berdasarkan hasil data pada tabel menunjukkan bahwa didalam minyak atsiri daun kemangi yang diidentifikasi terdapat 5 komponen senyawa yaitu methyl heptenon, limonene, cis-citral, citral b, geranyl acetate. jika disesuaikan dengan referensi adalah komponen senyawa tersebut sudah mewakili dengan komponen-komponen senyawa dari minyak atsiri daun kemangi. Dari hasil komponen senyawa menunjukkan komponen peak yang sudah sesuai dan memiliki kemiripan dengan referensi senyawa komponen minyak atsiri yaitu limonene, cis-citral, citral b, dimana hasil kadar (%) senyawa komponen minyak atsiri yang paling besar dan berpotensi mempunyai aktivitas antibakteri.

## 6. Hasil indeks bias minyak atsiri

Hasil penetapan indeks bias dapat dilihat pada table 6 dan lampiran

**Tabel 6. Hasil penetapan indeks bias minyak atsiri daun kemangi (*Ocinum basilicum L.)* dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)**

| Minyak atsiri | Hasil indeks bias (31° C) | Pustaka ( Anonim 1970) |
|---|---|---|
| **Daun kemangi** | 1,485 | 1,512 – 1,519 |
| **Daun jeruk nipis** | 1,476 | 1,474 – 1,476 |

Berdasarkan tabel 6 dapat dilihat hasil penetapan indeks bias minyak atsiri daun kemangi adalah 1,485 Secara umum nilai indeks bias minyak atsiri adalah 1,3 – 1,7. Jika minyak mengandung air nilai indeks bias biasanya akan lebih rendah. Standar mutu minyak *ocimum spp*. berdasarkan EOA (*Essential Oil Association*) nilai indeks bias sebesar 1,512 – 1,5190, sehingga jika dibandingkan dari hasil penelitian dengan standar mutu EAO tidak sama, sedangkan standard indeks bias minyak atsiri kemangi Ketaren (1987) adalah 1,49250 - 1,49597 nD maka nilai indeks bias sudah sesuai. Hasil indeks bias jeruk nipis yang didapat 1,476 dan hasil indeks bias menurut pustaka 1,474- 1,476 maka nilai indek bias minyak atsiri daun jeruk nipis sudah sesuai pustaka.

## 7. Penetapan bobot jenis minyak atsiri

Bobot jenis minyak atsiri adalah perbandingan bobot minyak atsiri terhadap bobot air pada suhu dan volume yang sama. Botol kosong ditimbang, kemudian masukkan 1 ml minyak atsiri ke dalam botol timbang. Menimbang minyak atsiri dan botol timbang dengan teliti dan akurat. Kemudian menghitung bobot minyak atsiri tersebut dengan bobot air pada suhu dan volume yang sama. Hasil penetapan bobot jenis minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis dapat dilihat pada tabel 7 dan 8. Perhitungan dapat dilihat dilampiran 17 dan 18.

**Tabel 7. Hasil bobot jenis minyak atsiri daun kemangi (*Ocinum basilicum* L.)**

| Percobaan | Bobot jenis minyak | Pustaka (Depkes 1970) |
|---|---|---|
| **I** | 0,941 | 0,952 – 0,973 |
| **II** | 0,929 | |
| **III** | 0,825 | |
| **Rata-rata** | 0,911 | |

**Tabel 8. Hasil bobot jenis minyak atsiri daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia)*

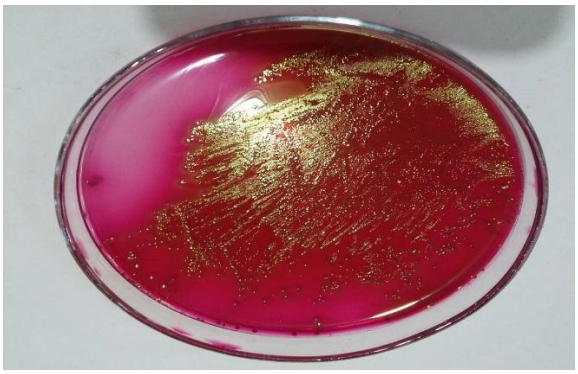
| Percobaan | Bobot jenis minyak | Pustaka (Depkes 1970) |
|---|---|---|
| **I** | 0,863 | 0,850-0,856 |
| **II** | 0,862 | |
| **III** | 0,839 | |
| **Rata-rata** | 0,854 | |

Berdasarkan Untuk mengetahui kriteria mutu minyak atsiri yang dihasilkan, hasil analisis dibandingkan dengan standar mutu minyak atsiri yang ada. Standar mutu minyak Ocimum spp. berdasar EOA (Anonim, 1970) standart mutu minyak *Ocimum spp*. dengan karakteristik bobot jenis yaitu 0,952 – 0,973 g/ml. Sehingga berat jenis (densitas) pada penelitian ini sudah mendekati karakteristik standart mutu minyak *Ocimum spp*. Menurut (DepKes, 1979) bobot jenis minyak atsiri daun jeruk adalah 0,850-0,856 sehingga berdasarkan pustaka sudah sessuai. Bobot jenis minyak atsiri salah satu kriteria penting dalam menentukan mutu dan kemurnian minyak atsiri. Maka semakin rendah bobot jenis suatu minyak atsiri maka semakin rendah kemurniannya. Berat jenis minyak atsiri dipengaruhi oleh jenis dan jumlah komponen kimia pada minyak (Wiyono *et al* 2000).

**8. Hasil identifikasi bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25292 dengan media selektif**

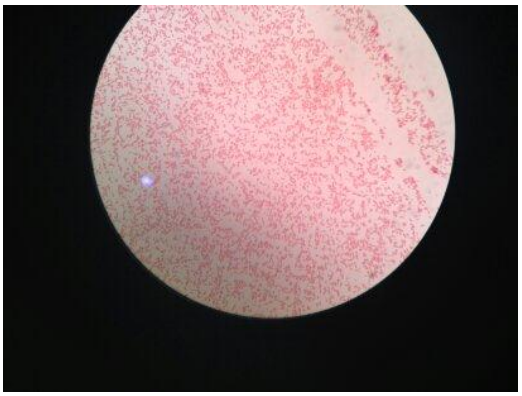
Identifikasi mikroskopis *Escherichia coli,* suspensi bakteri uji *Escherichia coli* diinokulasi pada media *Endo Agar* (EA) diinkubasi pada suhu 37º C selama

24-48 jam. Hasil positif didapatkan koloni yang dihasilkan berwarna merah dengan logam kilauan permanen dan warna medium merah violet (Volk dan Wheller 1988).



**Gambar 6. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan media selektif**

**9. Hasil identifikasi mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan pewarnaan gram**

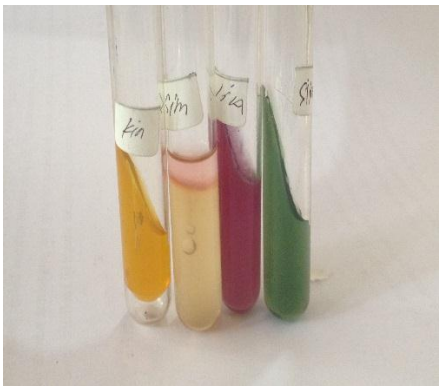


**Gambar 7. Hasil mikroskopis *Escherichia coli* ATCC 25922**

Pewarnaan Gram dilakukan untuk meyakinkan bahwa bakteri tersebut golongan *Escherichia coli.* Gram negatif didapatkan bila sel bakteri berwarna merah, bentuk bacilli berate positif golongan *Escherichia coli.* Pewarnaan gram dilakukan dengan cara dibuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian tetes Kristal violet (Gram A) sebagai pewarna utama pada kedua preparat sampai semua ulasan terwarnai, penetesan kristal violet (Gram A) menyebabkan seluruh

permukaan sel bakteri gram positif dan negative menjadi kristal ungu, didiamkan ± 1 menit. Kemudian, cuci dengan aquadest mengalir dan ditetesi mordant (*lugol,s iodine*/ Gram B), pada penetesan mordant (*lugol,s iodine*/ Gram B) menyebabkan adanya ikatan CV dengan idine yang akan meningkatkan afinitas pengikatan zat warna oleh bakteri, didiamkan selama ± 1 menit terbentuk CV iodine – ribonukleat didinding sel pada Gram positif. Kemudian, dicuci lagi dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C (alkohol) selama 30 detik, penetesan Gram C (alkohol) menyebabkan pori-pori pada Gram negatif yang mamiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol) sehingga komplek CV tidak menempel di dinding sel sehingga menyebabkan sel menjadi bening. Tetes counterstain (safari/ Gram D) dan didiamkan selama ± 45 detik, cuci dengan aquadest mengalir dan keringkan, preparat dengan kertas tissue yang ditempelkan disisi ulasan kemudian didiamkan sampai mongering diudara, penetesan ini menyebabkan safari akan mewarnai sel Gram negatif menjadi warna merah (Volk dan Wheller 1988).

**10. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 berdasarkan uji biokimia**



**Gambar 8. Hasil identifikasi berdasarkan uji biokimia *Escherichia coli* ATCC 25922**

Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 berdasarkan uji biokimia dapat dilihat pada tabel 9.

**Tabel 9. Hasil identifikasi *Escherichia coli* ATCC 25922 berdasarkan uji biokimia**

| Pengujia | Hasil | Pustaka |
|---|---|---|
| **SIM** | -++ | -++ |
| **KIA** | A/AG S(-) | A/AG S(-) |
| **LIA** | K/K S(-) | K/K S(-) |
| **CITRAT** | - | - |

Keterangan:

| | | | |
|---|---|---|---|
| SIM | : Sulfida Indol Mortility | A | : Kuning |
| KIA | : Kligers Iron Agar | K | : Merah atau Ungu |
| LIA | : Lysin Iron Agar | S | : Hitam |
| + | : Reaksi positif | G | : Gas |
| - | : Reaksi negative | | |

Hasil pengujian pada medium SIM menunjukkan (-++) yaitu *Escherichia coli* ATCC 25922 tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfide sehingga menghasilkan media tidak berwarna hitam. Artinya uji $H_2S$ negatife tidak terbentuknya warna hitam pada sulfide Indo lmotilitas (SIM). Pada penambahan tiga tetes Erlich A dan B, permukaan media berwarna merah muda berarti uji indol positif, artinya Escherichia coli membentuk indol dari tryptopan sebagai sumber karbon. Uji motilitas positif ditunjukkan dengan penyebaran pertumbuhan dimedia Sulfide Indol Imortilitas (SIM).

Hasil pengujian pada media KIA menunjukkan (A/AG S (-), yaitu bagian lereng dasar media berwarna kuning (A/A), hal ini berarti bakteri memfermentasi glukosa dan laktosa, G artinya terbentuknya gas ditandi dengan terangkatnya media. S(-) artinya $H_2S$ negatif dengan ditunjukannya tidak terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan menthion yang akan menghasilkan $H_2S$ dan $H_2$ akan bereaksi dengan $Fe^{++}$ yang terdapat pada media sehingga sehingga tidak terbentuk warna hitam. Medium KIA mengandung laktosa konsentrasi 1% dan glukosa 0,1% dan phenol res sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna dari merah menjadi kuning dalam

suasana asam. Medium KIA mengandung sodium thiosulfat yaitu susunan untuk penghasil $H_2S$.

Hasil pengujian LIA yaitu untuk mengetahui deaminasi lisin dan sulfida. Diperoleh K/K S (-) artinya pada lereng dan dasar media berwarna ungu. Menunjukkan bahwa bakteri tidak mendeaminasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media S(-) artinya uji $H_2S$ negatif dengan ditunjukkan tidak adanya warna hitam pada media LIA. Hasil pengamatan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa bakteri yang digunakan adalah *Eschericia coli.* Hasil pengujian pada medium Citrat diperoleh hasil negatif ditunjukkan pada media tetap berwarna hijau. Hal ini menunjukkan bahwa *Escherichia coli* menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Medium citrat terdapat media BTB (*Bromo thymol blue*) yang merupakan indicator pH, jika mikroba mampu menggunakan citrate maka menyebabkan suasana basa, sehingga meningkatnya pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru. Hasil pengamatan berdasarkan goresan dan uji biokimia menunjukkan bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922.

**11. Pembuatan suspensi bakteri**

Bakteri uji *Escherichia coli* dalam biakan murni pada media *Nutrient Agar* (NA) diambil masing-masing satu ose kemudian dimasukkan secara aseptis ke dalam tabung reaksi steril yang telah diisi media BHI (*Brain Heart Infusion*) cair sebanyak 5 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37ºC selama 24 jam. Selanjutnya pada metode dilusi dipipet sebanyak 0,01 ml dimasukkan dalam 10 ml BHI dengan pengenceran 1:1000 sehingga didapat kekeruhan yang sama dengan standard Mc Farlan (Jawez *et al* 1982).

**12. Hasil pengujian aktivitas bakteri minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis**

Hasil destilasi dengan uap air minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis didapatkan dengan pengujian aktivitas antibakteri secara mikrobiologi terhadap bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922. Metode yang digunakan adalah difusi untuk mendapatkan Diameter Daya Hambat dan dilusi untuk mendapatkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Hasil inokulasi pengujian daya hambat antibakteri kombinasi 1:1, 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, kontrol positif (+), minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* secara dilusi. Dapat dilihat pada tabel 10 dan 11. Perhitungan pada lampiran 12.

**Tabe l 10. Diameter hambat tunggal dari uji difusi minyak atsiri**

| Konsentrasi 100% (v/v) | Diameter daerah hambatan (mm) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | Rata-rata ± SD |
| **Kontrimoxasol** | 34,2 | 34,2 | 36,7 | 36,03±1.443 |
| **Kemangi** | 17,7 | 15,5 | 14,0 | 15,73± 1.861 |
| **Jeruk Nipis** | 10,0 | 10,0 | 12,2 | 13,73± 1.270 |

**Tabel 11. Diameter hambat kombinasi dari uji difusi minyak atsiri**

| Konsentrasi 100% (v/v) | Diameter daerah hambatan (mm) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | Rata-rata ± SD |
| **Kombinasi 1:1** | 16,5 | 14,7 | 13,5 | 14,90±1.509 |
| **Kombinasi 1:2** | 12,5 | 10,2 | 11,0 | 11,23±1.167 |
| **Kombinasi 1:3** | 24,0 | 23,5 | 23,5 | 23,66± 0.288 |
| **Kombinasi 2:1** | 15,5 | 12,2 | 11,0 | 12,9±2.330 |
| **Kombinasi 3:1** | 13,0 | 11,0 | 12,0 | 12,00±1.000 |

Berdasarkan hasil data pada tabel di atas pengujian dilakukan pada sampel uji tunggal minyak tasiri kemangi, minyak atsiri jeruk nipis dan kontromoksazol sebagai kontrol positif. Dari semua sampel menunjukkan adanya zona hambat artinya sampel tersebut mempunyai aktivitas antibakteri. Dari hasil data urutan sampel menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri dimulai dari yang kecil

yaitu sampel tunggal miyak atsiri jeruk nipis lebih kecil dari tunggal minyak atsiri kemangi. Tunggal minyak atsiri kemangi dan minyak atsiri jeruk nipis lebih kecil dari kontrimoksazol sebagai kontrol (+). Dari hasil data rata-rata zona hambat masing-masing sampel tunggal minyak atsiri kemangi, minyak atsiri jeruk nipis dan kotrimoksazol sebagai kontrol positif (+) adalah 15,73 mm; 13,73 mm dan 36,0 mm.

Pada uji sampel uji kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis. Sampel uji dilakukan 5 formula kombinasi (1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1). Dari hasil data urutan sampel menunjukkan zona hambat rata-rata pertumbuhan bakteri dimulai dari yang kecil yaitu kombinasi 1:2 yaitu 11,23 mm; kombinasi 3:1 yaitu 12,00 mm; kombinasi 2:1 yaitu 12.09 mm; kombinasi 1:1 yaitu 14,90 mm; kombinasi 1:3 yaitu 23,66 mm.

Pada hasil uji statistik kedelapan sampel minyak atsiri tunggal, kontrol positif kontrimoksazol, minyak atsiri kombinasi adanya perbedaan yang nyata yaitu pada kombinasi minyak atsiri 1:3. Hal ini berarti sampel kombinasi 1:3 berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri dimana kombinasi 1:3 mempunyai zona hambat yang lebih besar dari sampel yang lain. Berdasarkan hasil tersebut menunjukkan bahwa kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis pada perbandingan kombinasi 1:3 memiliki aktivitas antibakteri yang paling efektif dalam menghambat bakteri *Escherichia coli,* dimana dari hasil ini menunjukkan adanya efek sinergisme dari kombinasi minyak atsiri dan adanya aktivitas antibakteri yang lebih besar. Hal ini kemungkinan berpotensi adanya interaksi antara senyawa yang terkandung didalam minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis, Komponen utama minyak atsiri kemangi adalah Linalool, z-

citral, geraldehyde, eugenol dan komponen utama minyak atsiri daun jeruk nipis adalah limonene, cis-citral, citral b. Komponen utama yang kemungkinan berpotensi sebagai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah geraldehyde dan citral b karena mempunyai kadar (%) komponen senyawa didalam minyak atsiri lebih besar.

Hasil inokulasi pengujian daya antibakteri kombinasi 1:3 minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* secara dilusi dengan konsentrasi masing-masing 100%, 50%, 20%; 12,5; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19% kontrol positif (+), kontrol negatif (-). Dapat dilihat pada tabel 12.

**Tabel 12. Hasil inokulasi minyak atsiri daun kemangi terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 di medium Endo Agar**

| Konsentrasi (% b/v) | *Escherichia coli* ATCC 25922 | | |
|---|---|---|---|
| | Minyak atsiri daun kemangi dan ddaun jeruk nipis kombinasi 1:3 | | |
| | I | II | III |
| Kontrol (-) | - | - | - |
| 100% | - | - | - |
| 50% | - | - | - |
| 25% | - | - | - |
| 12,5% | - | - | - |
| 6,25% | + | + | + |
| 3,125% | + | + | + |
| 1,562% | + | + | + |
| 0,78% | + | + | + |
| 0,39% | + | + | + |
| 0,19% | + | + | + |
| Kontrol (+) | + | + | + |

Hasil pengujian berdasarkan tabel aktivitas antibakteri dengan seri konsentrasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dengan menggunakan metode dilusi. Hasil uji aktivitas antibakteri secara dilusi menunjukkan konsentrasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocinum basilicum* L.) dan daun jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

memiliki daya bunuh terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 yang dibuktikan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media setelah diinokulasikan pada media *Endo agar*. Hasil pada tabel di atas menunjukkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) minyak atsiri daun kemangi dan jeruk nipis dengan konsentrasi 100%, 50%, 20%; 12,5; 6,25%; 3,125%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; kontrol negatif (-); kontrol (+) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 adalah 12,5%. Hasil uji aktivitas antibakteri konsentrasi 12,5% menunjukkan bahwa minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis pada memiliki aktivitas antibakteri paling efektif dalam membunuh *Escherichia coli* ATCC 25922. Menunjukkan bahwa kombinasi adanya hubungan yang positif antara konsentrasi dengan daya bunuh atau daya antibakteri yaitu dengan semakin besar konsentrasi maka semakin besar daya bunuh atau daya antibakteri. Karena, hal ini disebabkan semakin besar konsentrasi, maka semakin banyak kandungan zat aktifnya serta kombinasi keduanya menunjukkan bahwa komponen dari kedua minyak atsiri memiliki daya bunuh terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Pada hasil identifikasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis yang mempunyai komponen senyawa yang paling besar dan berpotensi sebagai anibakteri yaitu citral b dan geraldehyde yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri.

Minyak atsiri daun kemangi dan jeruk nipis memiliki aroma khas, karena aroma tersebut adalah sebuah senyawa bergugus fungsi aldehid, yakni sitral (Irham 2011). Geraniol dan sitral merupakan komponen terbesar pada minyak atsiri, dan sekaligus merupakan antibakteri pada minyak atsiri daun jeruk nipis.

Sifat antibakteri adalah senyawa yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Berdasarkan aktivitasnya zat antibakteri dibedakan menjadi 2 jenis, yaitu bakteriostatik (menghambat bakteri) dan bakteriosidal (membunuh bakteri) (Irianto 2006). Berdasarkan aktifitas antibakteri yang ditunjukkan dari hasil pengukuran diameter daya hambat terhadap kedua bakteri uji, maka diperoleh sifat antibakteri minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis adalah bakteriosidal (membunuh bakteri). Hal ini ditunjukkan dengan peningkatan zona bening di sekitar sumuran dan hasil konsentrasi bunuh minimum (KBM) dari media uji terhadap bakteri *Escherichia coli* setelah inkubasi selama 24 jam hingga 48 jam. Kandungan senyawa minyak atsiri lainnya adalah limonen dimana termasuk golongan hidrokarbon monoterpene juga mempunyai aktivitas antibakteri, mekanisme kerja dari monoterpen hidrokarbon adalah mendisintegrasi membran terluar dari bakteri (Bassole & Rodolfo, 2012).

# BAB V

# KESIMPULAN DAN SARAN

## A. Kesimpulan

Hasil ini dapat disimpulkan bahwa:

Pertama, kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Kedua, perbandingan kombinasi 1:3 minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mempunyai aktivitas antibakteri yang paling efektif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ketiga, Konsentrasi Bunuh Minimun (KBM) dari kombinasi (1:3) minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25292 adalah 12.5%

## B. Saran

Pertama, perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri daun kemangi (*Ocimun basilicum* L.) dan jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* terhadap bakteri dan jamur patogen lainnya

Kedua, perlu dilakukan penelitian aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri dengan tanaman lainnya sehingga dapat diketahui aktivitas yang lebih efektif.

Ketiga, perlu dilakukan uji klinik dan praklinik dari kombinsi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis.

# DAFTAR PUSTAKA


Depkes, (1977). Materia Medika Indonesia, Jilid I, Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal 135

Depkes, (1979). Materia Medika Indonesia, Edisi III, Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Hal 125

Agusta, 2000. *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia*. ITB. Bandung. Hal 23

Alantas Z, Nurhayati S, 2006. Efek kombinasi paparan radiasi pengion dengan bahan kimia. Batan: Pusat Teknologi Keselamatan dan Metrologi Radiasi.

Ali, H & Savita, D, 2012, 'In Vitro Antimikrobial Activity of Flavonoids of *Ocimum sanctum* with Synergistic Effect of Their Combined Form', *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*

Bassole, I & Rodolfo J., 2012, Essential oils ini Combination and Their Antimicrobial Properties. J. *Moleculs,* 17, 3989-400

Depkes RI, 2001, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia*, Edisi I, Jilid II, Badan Penelitian dan Pengembangan Depkes RI, Jakarta. Hal 245-246

Dharmayanti, S. 2013. *Berbagai Khasiat Daun Kemangi.* http://www.pikiranrakyat.com/cetak/0103/19/ 1003.htm

Dongmo, P.M.J., Tatsadjieu, L. N., Sonwa, E.T., Kuate, J., Zollo,P.H.A., Menut, C., 2009. Essential oils of *Citrus aurantifolia* from Cameroon and there antifungal activity againts Phaeoramularia angolensis**.** *African Journal of Agricultural Research***,** 4, 354-358.

Dzen, SM, Roektiningsih, Santoso, S and Winarsih, S. 2003. Bakteriologi Medik Tim Mikrologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang: Hal 35

Ganiswara, 1995. Farmakologi dan tera. Edisi IV. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hal 12

Guenther, E. 1987. *Minyak atsiri*. Diterjemahkan oleh R.S. Ketaren. Jakarta: UI Press. Hal 132-133

Guenther, E. 1990. *Minyak atsiri*. Diterjemahkan oleh R.S. Ketaren. Jakarta: UI Press. Hal 156

Gunawan D, Mulyani S, 2004. *Ilmu Obat Alam*. Jakarta: Penebar Swadaya. Hal 9

Hadieotomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*. Jakarta: Gramedia. Hlm 44

Hadipoentyanti, Endang., & Wahyuni, Sri. 2008. *Keragaman Selasih (cinum spp.) Berdasarkan Karakter Morfologi roduksi dan Mutu Herbal*. Jurnal Litri. Vol (4) (Online). (Oktober 2015) http:/www.perkebunan.lifbang.deptan. go.id

Harbone J.B 1987. *Metode Fitokimia*, terbitan kedua. Penerbit ITB. Bandung. Hal 21

Irianto, Koes. 2006. Menguak Dunia Mikroorganisme. YRAMA Widya. Bandung. Hal 7-8

Irham HR. 2011. *Cymbopogon citratus.* http://tumbuhanektum.blogspot.com/ 2011/2/-citratus.html

Jane, S. (2011) *Situasi Diare di Indonesia*, *Buletin Jendela data dan informasi Kesehatan*, vol 2,

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1986. *Review of Medical Microbiology*. Ed ke-22. Bonang G, penerjemah; Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran. Hlm 320-329

Jawetz E, Melnick; dan Adelberg's. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*, Salemba Medika, Jakarta: hlm 239-241

Jawetz E, Melnick JL. Adelberg EA. 2008. *Microbiologi Kedokteran* ED ke-23, penerjemah; Hartanto C, Rachman C, Dimanti A, Diani A, editor Eleferia CK, Ramadhani D, Karolina S, Indriyani F, Rianti SS, Yulia P, Jakarta: EGC. Terjemahan dari: *Medical Microbiology*.

Juliantina R., Farida, dkk. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Antibakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia* Vol.1

Kardinan, A., Gunandini, D. J & Iffah, D. 2007. Pengaruh Ekstrak Kemangi (*Ocinum basilicum forma Citratum*) terhadap Perkembangan Lalat Rumah (Muscadomestica) (L.). J. *Entomol*. Indonesia. Vol. 5. No. 1.36-44.

Kateryna Kon, Mahendra Rai. 2012. Antibacterial activity of *Thymus vulgaris* essential *oil alone and incombination with other essential oils.* Nusantara Bioncience 4 (2): 50-56, July 2012

Kee JL, Hayes ER. 1994. *Farmakologi, pendekatan Proses Keperawatan.* Anugerah P, penerjemah; Asih Y, editor. Jakarta: Penerbit Buku

Kedokteran EGC. Terjemahan dari: *Pharmacology, a nursing process approach*

Lota, Marie Laure. Dkk. Volatile Components of Peel and Leaf Oils of Lemonand Lime Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [serial online] 2002 [cited: 2013 Jul 22]; 50, (4); 796–805.Available from:URL: HIPERLINK http://fres.univcorse.fr/IMG/pdf/2002_JAFC_CitronsLimes pdf Triwulan 2 [Diakses 30 desember 2014]

Manawean, Yulia. 2010. *Khasiat Daun Kemangi*. Hal 17. http:/yuliamanawean.student.umm.ac.id/2015/02/10/khasiat daun kemang

Mangonting D, Irawan I, Abdullah S. 2005. *Tanaman Lalap Berkhasiat Obat.* Jakarta: Penebar Swadaya. Hlm 63-68

Martono, Budi., Hadipoentyanti, Endang., & Udarmo, Laba. 2004. Plasma Nutfah insektisida Nabati. Balai Penelitian Tanaman Rempah dan obat Perkembangan Teknologi TRO VOL. XVI, No 1, hal 52

Maryati., Ratna, S. F., dan Triastuti, R., 2007, Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.*)* Terhadap *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli*, *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol 8. No 1. 30-38

Onyeagba, R, A., Ugbogu, O,C., Okeke, C, U., Iroakasi, O., 2004. Studies on the antimicrobial effect of garlic (*Allium sativum* Linn), ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and lime (*Citrus aurantifolia* Linn***).*** *African Journal of Biotechnology* Vol 3 (10), PP 552-554. http://www.academicjournals. org/AJB ISSN 1684–5315 © 2004 Academic Journals (Diakses 2 Oktober 2015)

Putra WS, 2015. *Kitab Herbal Nusantara*. Yogyakarta: KATAHATI.Hal 141.

Ramesh, B., & Satakopan, V. N., 2010, In Vitro Antioxidant Activities of Ocimum

Reddy, J.L., Jalli, D.V., Jose, B., Gopu, S., 2012. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the leaf essential oil and leaf extract of *Citrus aurantifolia*. *Asian Journal of biochemical and pharmaceutical research*. 2:346-354.

Sarwono, B. 2003**.** *Khasiat dan Manfaat Jeruk Nipis.* Penerbit Agro Media Pustaka, Jakarta. Hal 3

Sastrohamidjojo, H., 2004. Kimia Minyak atsiri, Penerbit Gadjah Mada University Press, Yogyakarta. Hlm 15.

Siswandono dan Soekardjo, 2000. *Kimia Medicinal*. Airlangga University Press. Surabaya. Hlm 12

Sutiyami, Siti Nuryani 2014. uji antivitas minyak atsiri kemangi (Ocinum sanctum L.) pada berbagai kuman diare. KTI. Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta

Tan H.T dan Rahardja, K., 2002. *Obat-Obat Penting, Khasiat, Penggunaan, dan Efek Sampingnya*. Edisi ke empat. Gramedia. Jakarta.

Todar K. 2008. *Pathogenic E. coli*. http://www.textbookofbacteriology.net diakses 10 desember 2015

Volk, w.A. dan Wheeler, MF., 1988. *Mikrobiologi Dasar*, Penerbit, Erlangga, Jakarta, hal 331-335.

Whambete KD. 2009. *The in vitro Antimicrobial Activity of Fruit and Leaf Crude Extracts of Momordica charantia: A Thanzania Medical Plant*. African Health Sciences vol 9 no 1: 34-39 http://www. Ncib. nlm. nih. gov/pubmed/8025902.[Diakses30desember2014]

Widyarto *et al* (2009) *Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Keprok (Citrus nobilis Lour.) Terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli.* Skripsi thesis, Univerversitas Muhammadiyah Surakarta

Wiyono, B. Hartoyo dan Poedji Hastoeti. 2000. Sifat dasar minyak keruing dan kemungkinan penerapan baku mutunya. Buletin Penelitian Hasil Hutan. 18 (2) 123-135. Pusat Penelitian Hasil Hutan, Bogor.

Yuliani, Y. 2001. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Ekstrak Rimpang Temu Putri (*Curcuma *Petiolata Roxb.)*. Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Padjajaran.

**Lampiran 1. Surat keterangan hasil determinasi tanaman kemangi (*Ocinum basilicun* L.) dan tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)**

**DEPARTEMEN BIOLOGI FARMASI**
**FAKULTAS FARMASI**
**UNIVERSITAS GADJAH MADA YOGYAKARTA**
Alamat: Sekip Utara Jl. Kaliurang Km 4, Yogyakarta 55281
Telp. , 0274.649.2568 Fax. +274-543120

**SURAT KETERANGAN**
**No.: BF/ 45/ Ident /I/2016**

Kepada Yth. :
**Sdri/Sdr. Riciliani**
**NIM. 18123681 A**
**Fakultas Farmasi USB**
**Di Surakarta**

Dengan hormat,

Bersama ini kami sampaikan hasil identifikasi sampel tumbuhan yang Saudara kirimkan ke Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM, adalah :

| No.Pendaftaran | Jenis | Suku |
|---|---|---|
| 457 | *Citrus aurantifolia* ( Christm. & Panz. ) Swingle | Rutaceae |
| | *Ocimum basilicum* L. forma *citratum* Back. | Lamiaceae |

Demikian, semoga dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 19 Januari 2016
Ketua

Drrer.nat. Triana Hertiani, M.Si., Apt.
NIP. 197306091998032003

**Lampiran 2. Foto tanaman**

**Kemangi (*Ocinum basilicum* L.)**

**Jeruk nipis (*Citrus Aurantifolia*)**

**Lampiran 3. Foto alat destilasi uap air**

**Alat destilasi uap air**

**Lampiran 4. Foto alat inkubator dan oven**

**Alat inkubator**

**Alat oven**

**Lampiran 5. Foto alat inkas dan timbangan**

**Alat inkas**

**Alat neraca**

**Lampiran 6. Foto alat refraktometer dan alat Gc-MS**

**Alat refractometer**

**Alat GC-MS**

**Lampiran 7. Hasil destilasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis**

**Minyak atsiri kemangi**

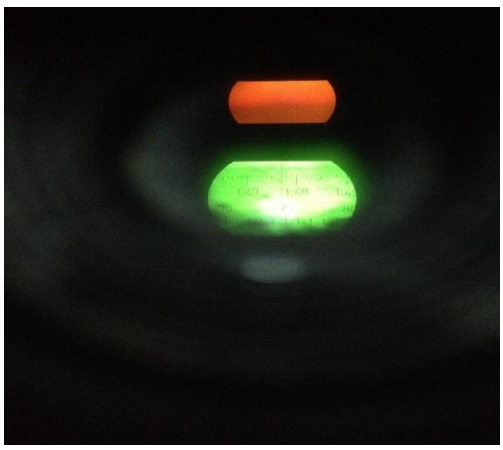
**minyak atsiri jeruk nipis**

**Lampiran 8. Foto hasil biakan *Escherichia coli* ATCC 25922**

**Foto hasil biakan *Escherichia coli* ATCC 25922**

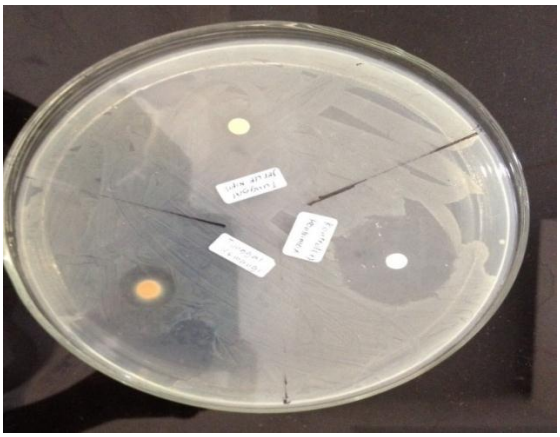
**Lampiran 9. Hasil pemeriksaan indeks bias minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis**

**A. Hasil Indeks bias minyak atsiri daun kemangi**

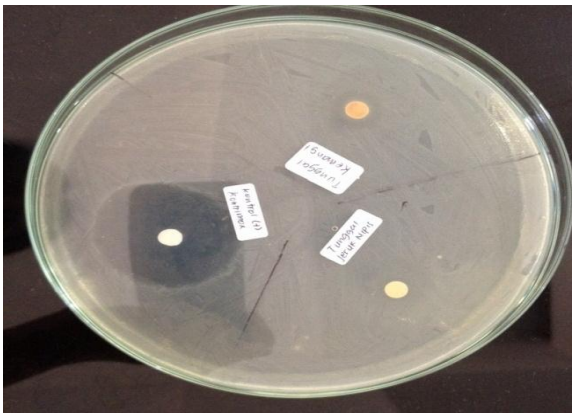


**B. Hasil indeks bias minyak atsiri daun jeruk nipis**

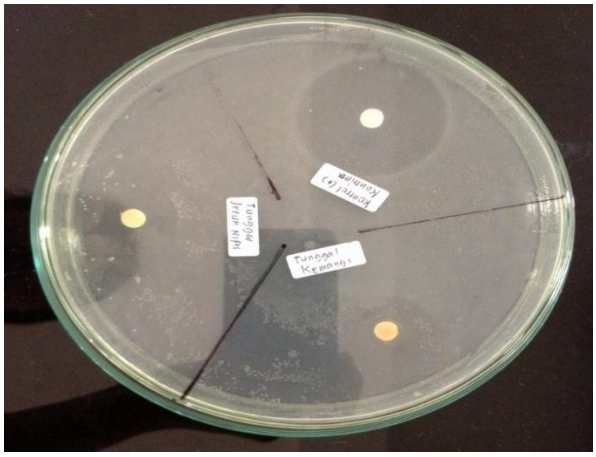
**Lampiran 10 Foto hasil difusi dan inokulasi tunggal minyak atsiri daun kemangi, daun jeruk nipis dan kontrol positif (+) terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922**



Gambar: hasil difusi replikasi 1

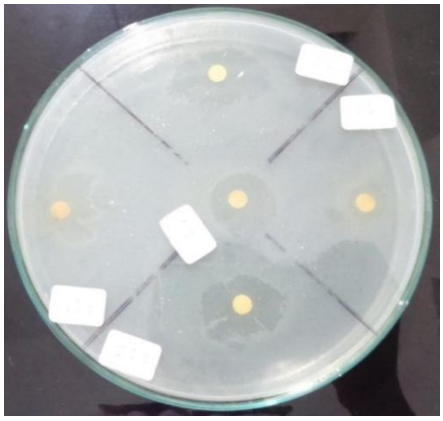


Gambar: hasil difreplikasi 2

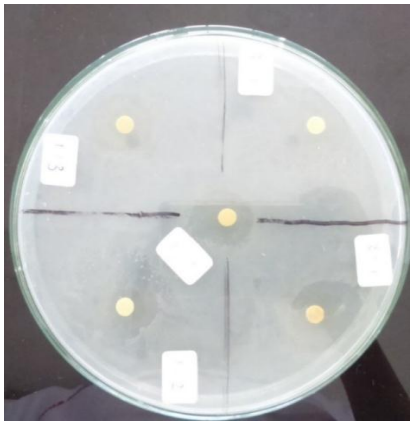


Gambar: hasil difusi replikasi 3

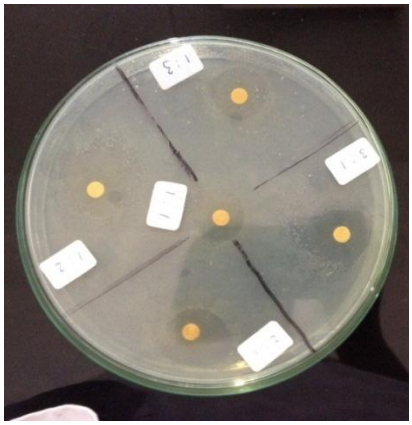
**Lampiran 11. Foto hasil difusi dan inokulasi kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922**



Gambar: hasil difusi kombinasi replikasi 1



Gambar: hasl difusi kombinasi replikasi 2

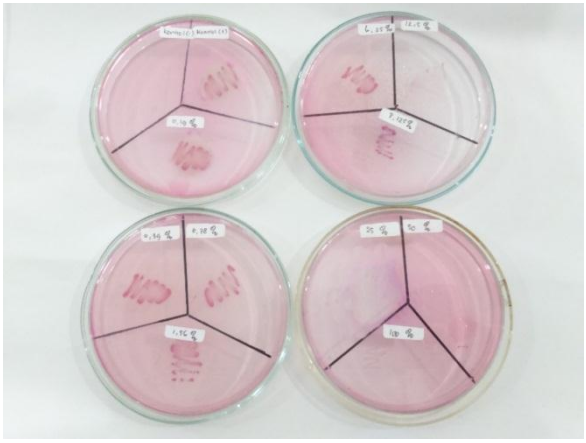


Gambar: hasil difusi kombinasi replikasi 3

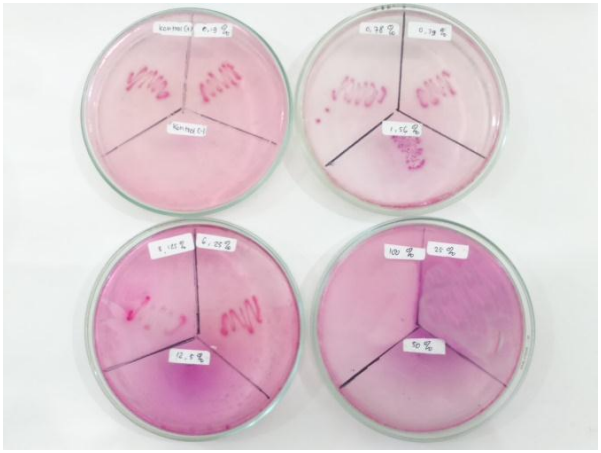
**Lampiran 12. Foto hasil dilusi minyak atsiri terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922**

**Hasil dilusi minyak atsiri**

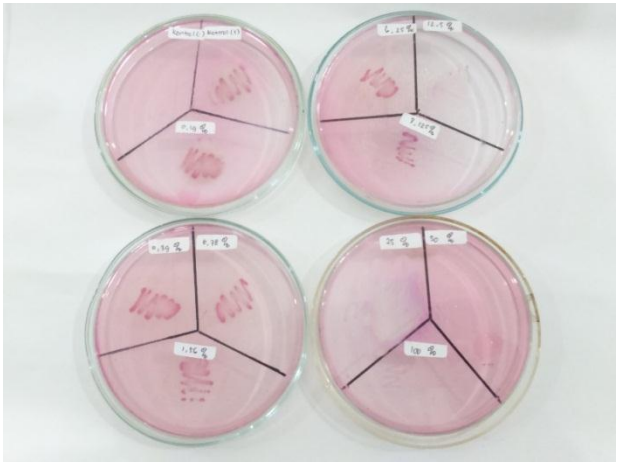
**Lampiran 13. Foto hasil goresan dilusi minyak atsiri pada media *Endo Agar***



**Hasil goresan uji difusi reflikasi 1**



**Hasil goresan uji dilusi reflikasi 2**



**Hasil goresan uji reflikasi 3**

**Lampiran 14 Perhitungan hasil prosentase rendemen minyak atsiri daun kemangi**

Perhitungan kadar rendemen minyak atsiri daun kemangi:

% rendemen = $\frac{\text{Hasil ekstraksi}}{\text{Bobot sampel}}$ x 100%

Persen rendemen = $\frac{10\ \text{ml}}{5000\ g}$

= 0,2%

Jadi, persen dari hasil destilasi minyak atsiri daun kemangi adalah 0,2 %.

**Lampiran 15. Perhitungan hasil prosentase rendemen minyak atsiri daun jeruk nipis**

Perhitungan kadar rendemen ekstrak etanolik daun jeruk nipis:

% rendemen = $\frac{\text{Hasil ekstraksi}}{\text{Bobot sampel}}$ x 100%

Persen rendemen = $\frac{9{,}6\ ml}{50000\ g}$

= 0,19 %

Jadi, persen rendemen dari destilasi uap air minyak atsiri daun jeruk nipis adalah 0,19%

**Lampiran 16. Hasil perhitungan indeks bias minyak atsiri**

| Minyak atsiri | Hasil indeks bias (31º C) | Pustaka ( Anonim 1970) |
|---|---|---|
| **Daun kemangi** | 1,485 | 1,512 – 1,519 |
| **Daun jeruk nipis** | 1,476 | 1,474 – 1,476 |

Perhitungan konversi suhu pada setiap kenaikan 1ºC= 0,0044

Indeks bias teoritis 20ºC= 1,559-1,595

Suhu ruang praktek 31ºC

Perhitungan:

= ((31-20) x 0,0004) = 0,0004

Indeks bias pada suhu 31ºC = (1,512 + 0,0044) – (1,519 + 0,0044)

Jadi, indeks bias teoritis pada kemangi adalah = 1,516 – 1,523

= ((31-20) x 0,0004) = 0,0004

Indeks bias pada suhu 31ºC = (1,474 + 0,0044) – (1,476 + 0,0044)

Jadi, indeks bias teoritis pada jeruk nipis adalah = 1,478 – 1,480

Indeks bias pada minyak atsiri daun kemangi menurut praktek adalah 1,485

Indeks bias pada minyak atsiri daun jeruk nipis menurut praktek adalah 1,476

Jadi, indeks bias menurut hasil penelitian sama dengan indeks bias menurut pustaka.

**Lampiran 17. Perhitungan hasil bobot jenis minyak atsiri daun kemangi**

1. Bobot botol timbang kosong + air = 24,539 gram

   Bobot botol timbang kosong = 23,567 gram

   Bobot air = 0,972 gram

   Bobot botol timbang kosong + minyak = 24,588 gram

   Bobot botol timbang kosong = 23,673 gram

   Bobot minyak = 0,915 gram

   $$\text{Bobot jenis} = \frac{\text{bobot minyak}}{\text{bobot air}}$$

   $$= \frac{0,915}{0,972}$$

   $$= 0,941$$

2. Bobot botol timbang kosong + air = 24,528 gram

   Bobot botol timbang kosong = 23,547 gram

   Bobot air = 0,981 gram

   Bobot botol timbang kosong + minyak = 24,478 gram

   Bobot botol timbang kosong = 23,567 gram

   Bobot minyak = 0,911 gram

   $$\text{Bobot jenis} = \frac{\text{bobot minyak}}{\text{bobot air}}$$

   $$= \frac{0,911}{0,981}$$

   $$= 0,929$$

3. Bobot botol timbang kosong + air = 24,570 gram

   Bobot botol timbang kosong = 23,596 gram

   Bobot air = 0,974 gram

   Bobot botol timbang kosong + minyak = 24,426 gram

   Bobot botol timbang kosong = 23,622 gram

   Bobot minyak = 0,804 gram

$$\text{Bobot jenis} = \frac{\text{bobot minyak}}{\text{bobot air}}$$

$$= \frac{0{,}804}{0{,}974}$$

$$= 0{,}825$$

Rata-rata bobot jenis minyak atsiri daun kemangi

$$= \frac{0{,}981+0{,}929+0{,}825}{3}$$

$$=0{,}911$$

**Lampiran 18. Perhitungan hasil bobot jenis minyak atsiri daun jeruk nipis**

1. Bobot botol timbang kosong + air = 21,570 gram

   Bobot botol timbang kosong = 20,639 gram

   Bobot air = 0,931 gram

   Bobot botol timbang kosong + minyak = 21,426 gram

   Bobot botol timbang kosong = 20,622 gram

   Bobot minyak = 0,804 gram

   $$\text{Bobot jenis} = \frac{\text{bobot minyak}}{\text{bobot air}}$$

   $$= \frac{0,804}{0,931}$$

   $$= 0,863$$

2. Bobot botol timbang kosong + air = 21,178 gram

   Bobot botol timbang kosong = 20,196 gram

   Bobot air = 0,982 gram

   Bobot botol timbang kosong + minyak = 21,086 gram

   Bobot botol timbang kosong = 20,224 gram

   Bobot minyak = 0,862 gram

   $$\text{Bobot jenis} = \frac{\text{bobot minyak}}{\text{bobot air}}$$

   $$= \frac{0,862}{0,982}$$

   $$= 0,877$$

3. Bobot botol timbang kosong + air = 21,164 gram

   Bobot botol timbang kosong = 20, 178 gram

| | |
|---|---|
| Bobot air | = 0,986 gram |
| Bobot botol timbang kosong + minyak | = 21,059 gram |
| Bobot botol timbang kosong | = 20,236 gram |
| Bobot minyak | = 0,823 gram |

$$\text{Bobot jenis} = \frac{\text{bobot minyak}}{\text{bobot air}}$$

$$= \frac{0,823}{0,986}$$

$$= 0,834$$

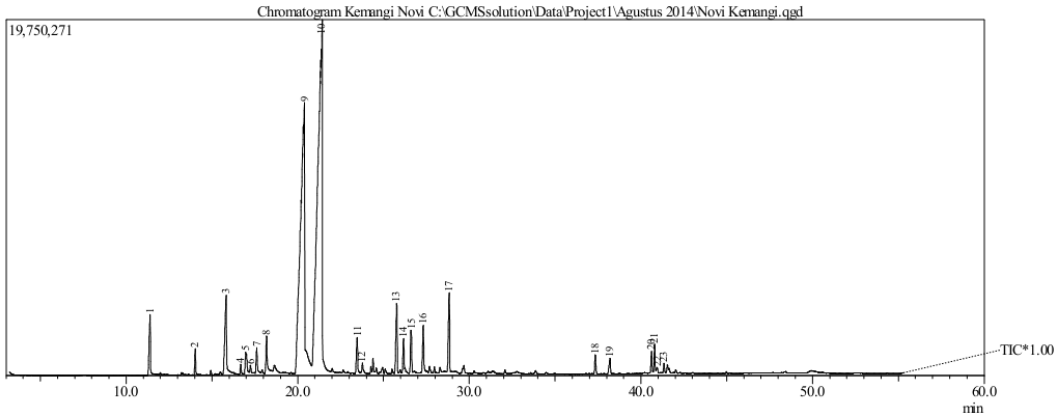
Rata-rata bobot jenis minyak atsiri daun jeruk nipis

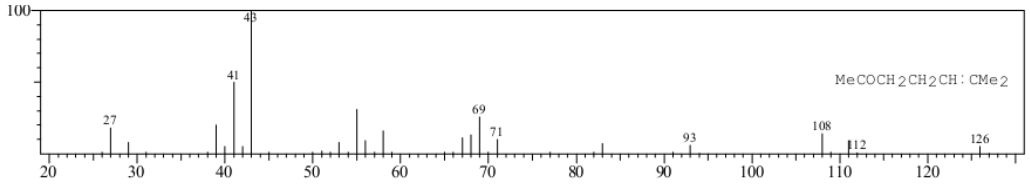
$$= \frac{0,970+0,979+0,991}{3}$$

$$=0,983$$

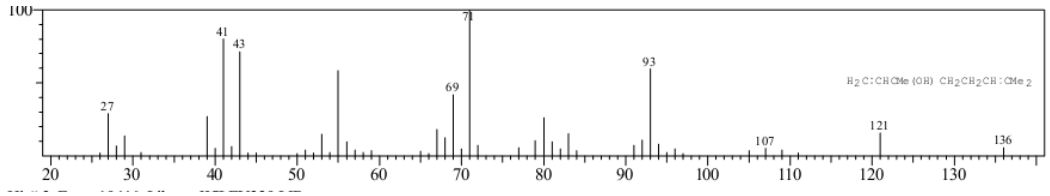
**Lampiran 19. Hasil analisis GCMS minyak atsiri daun kemangi**

**Kromatogram minyak atsiri daun kemangi**

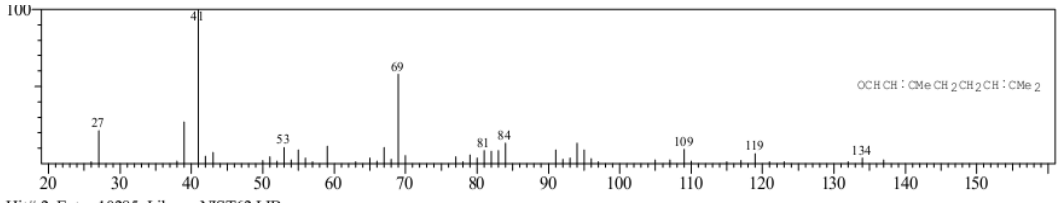


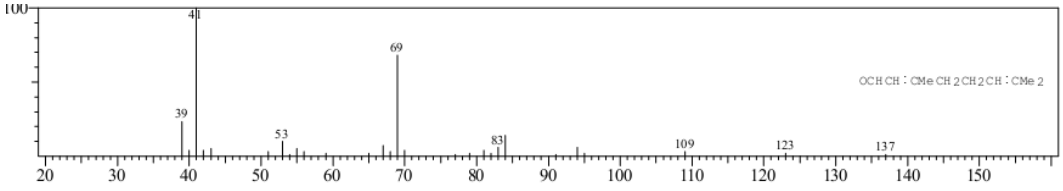

**A. 6-methyl -5-hepten-2-one**



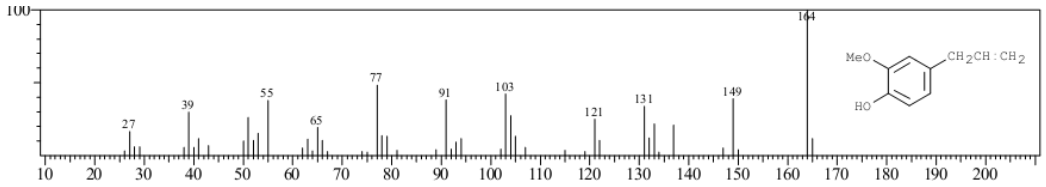

**B. linalool**



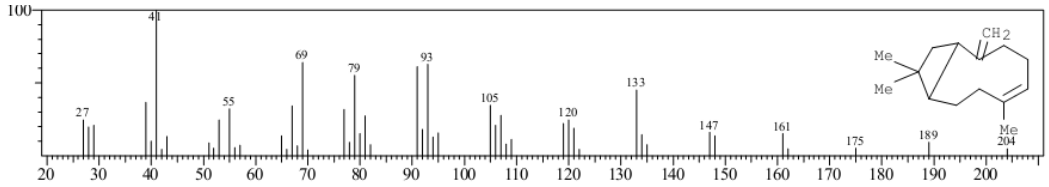

**C. z-citral**



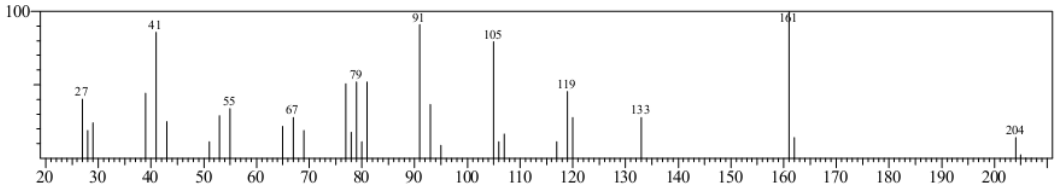

**D. geraldehyde**



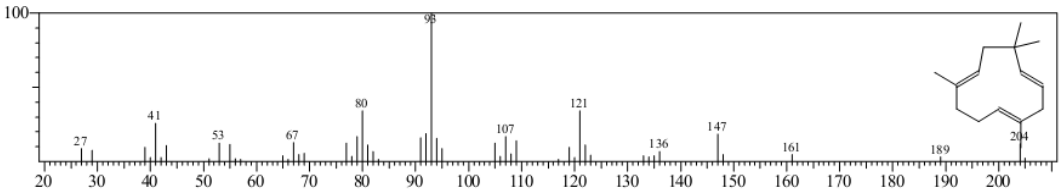

**E. eugenol**




**F. beta-caryophyllene**



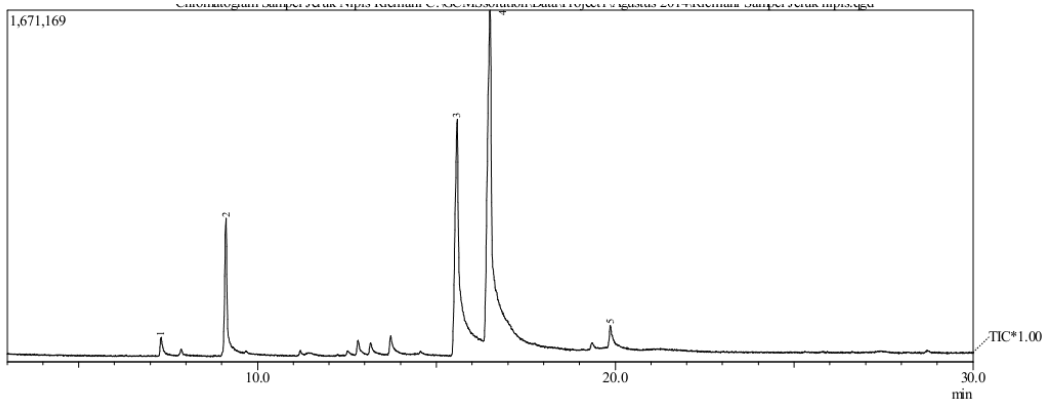

**G. germacrene**

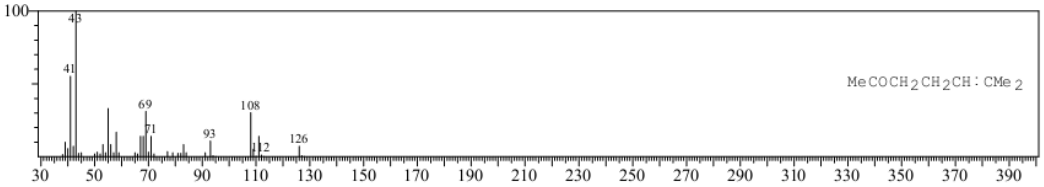



**H. alpha-caryophylene**

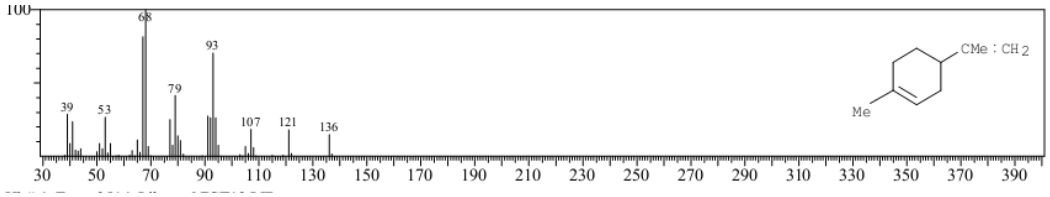
**Lampiran 20. Hasil analisis GCMS minyak atsiri daun jeruk nipis**

**Kromatogram minyak atsiri daun kemagi**

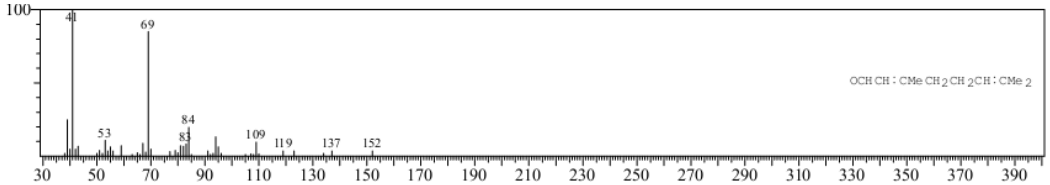


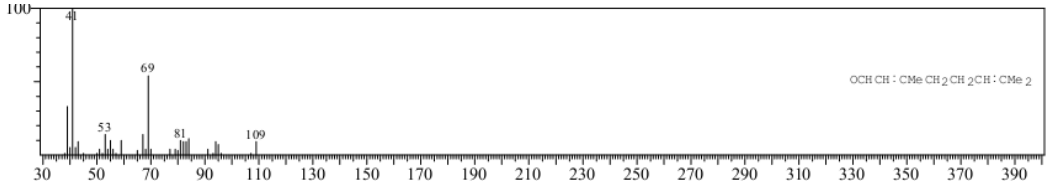

**A. Limonenne**



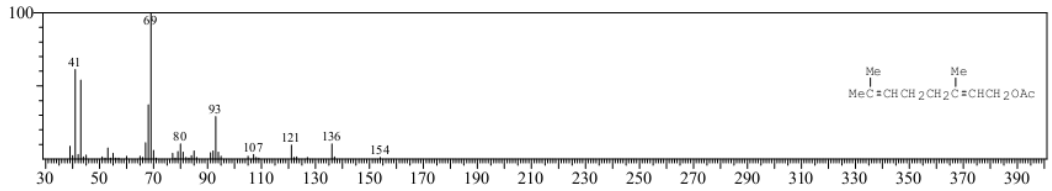

**B. Methyl heptenone**




**C. cis-citral**




**D.citral b**




**E. graniolacetate**

## Lampiran 21. Hasil perhitungan diameter daerah hambatan (mm)

**Tabel 13. Diameter hambat tunggal dari uji difusi minyak atsiri**

| Konsentrasi 100% (v/v) | Diameter daerah hambatan (mm) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | Rata-rata ± SD |
| **Kontrimoxasol** | 34,2 | 34,2 | 36,7 | 36.03± 1.443 |
| **Kemangi** | 17,7 | 15,5 | 14,0 | 15.73± 1.861 |
| **Jeruk Nipis** | 10,0 | 10,0 | 12,2 | 13.73± 1.270 |

Dari hasil data disimpulkan rata-rata diameter daerah hambat konsentrasi kotrimoksazol adalah lebih besar terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dibandingkan dengan hasil rata-rata tunggal minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis.

**Tabel 14. Diameter hambat kombinasi dari uji difusi minyak atsiri**

| Konsentrasi 100% (v/v) | Diameter daerah hambatan (mm) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I | II | III | Rata-rata ± SD |
| **Kombinasi 1:1** | 16,5 | 14,7 | 13,5 | 14,90± 1.509 |
| **Kombinasi 1:2** | 12,5 | 10,2 | 11,0 | 11,23± 1.167 |
| **Kombinasi 1:3** | 24,0 | 23,5 | 23,5 | 23,66± 0.288 |
| **Kombinasi 2:1** | 15,5 | 12,2 | 11,0 | 12,9± 2.330 |
| **Kombinasi 3:1** | 13,0 | 11,0 | 12,0 | 12,00± 1.000 |

Dari hasil data disimpulkan rata-rata diameter daerah hambat kombinasi 1:3 terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 lebih besar dan mempunyai aktivitas antibakteri lebih efektif dibandingkan dengan hasil rata-rata kombinasi minyak atsiri daun kemangi dan daun jeruk nipis 1:1, 1:2, 2:1, 3:1.

**Lampiran 22. Pembuatan konsentrasi kontrimoksazol**

Disiapkan 3 gelas ukur. Pipet suspensi kontrimoksazol 0,5 ml masukkan digelas ukur 1 di ad air sampai volume 10 ml, kemudian dari gelas ukur 1 pipet 0,5 ml dimasukkan ke gelas ukur ke 2 di ad air sampai volume 10 ml, kemudian pipet 0,5 ml dari tabung 2 dimasukkan ke tabung 3 di ad air sampai volume 10 ml. pada pengenceran tabung ke 3 yang digunakan sebagai kontrol positif (+) uji aktivitas antibakteri tunggal kontrimoksazol secara difusi.

**Lampiran 23. Hasil analisisa SPSS**

## A. Pengujian normalitas data variabel daya hambat

**Descriptive Statistics**

| | N | Mean | Std. Deviation | Minimum | Maximum |
|---|---|---|---|---|---|
| Dayahambat | 24 | 17.0250 | 8.08812 | 10.00 | 36.70 |

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

| | | Dayahambat |
|---|---|---|
| N | | 24 |
| Normal Parameters[a,b] | Mean | 17.0250 |
| | Std. Deviation | 8.08812 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .241 |
| | Positive | .241 |
| | Negative | -.193 |
| Kolmogorov-Smirnov Z | | 1.183 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .122 |

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Berdasarkan hasil output diatas dapat dilihat bahwa uji normalitas dengan menggunakan Kolmogorov-Smirnov Z menunjukkan hasil zig = 0,122 (>0,005) dapat disimpulkan bahwa hasil data daya hambat terdistribusi normal.

## B. Uji homogenitas varians variabel daya hambat

## Oneway

**Descriptives**

Dayahambat

| | | N | Mean | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean | | Min | Max | Between-Component Variance |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | Lower Bound | Upper Bound | | | |
| 1 | | 3 | 35.0333 | 1.44338 | .83333 | 31.4478 | 38.6189 | 34.20 | 36.70 | |
| 2 | | 3 | 15.7333 | 1.86100 | 1.07445 | 11.1103 | 20.3563 | 14.00 | 17.70 | |
| 3 | | 3 | 10.7333 | 1.27017 | .73333 | 7.5781 | 13.8886 | 10.00 | 12.20 | |
| 4 | | 3 | 14.9000 | 1.50997 | .87178 | 11.1490 | 18.6510 | 13.50 | 16.50 | |
| 5 | | 3 | 11.2333 | 1.16762 | .67412 | 8.3328 | 14.1339 | 10.20 | 12.50 | |
| 6 | | 3 | 23.6667 | .28868 | .16667 | 22.9496 | 24.3838 | 23.50 | 24.00 | |
| 7 | | 3 | 12.9000 | 2.33024 | 1.34536 | 7.1114 | 18.6886 | 11.00 | 15.50 | |
| 8 | | 3 | 12.0000 | 1.00000 | .57735 | 9.5159 | 14.4841 | 11.00 | 13.00 | |
| Total | | 24 | 17.0250 | 8.08812 | 1.65098 | 13.6097 | 20.4403 | 10.00 | 36.70 | |
| Model | Fixed Effects | | | 1.47125 | .30032 | 16.3884 | 17.6616 | | | |
| | Random Effects | | | | 2.95801 | 10.0304 | 24.0196 | | | 69.27712 |

**Test of Homogeneity of Variances**

Dayahambat

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|---|---|---|---|
| 1.392 | 7 | 16 | .275 |

Dari hasil output daya hambat uji homogenitas varians dengan menggunakan uji *levene* menunjukkan hasil zig = 0,275 (>0,05) dapat disimpulkan bahwa data daya hambat memiliki varians yang sama sehingga dapat dilakukan analisis lebih lanjut.

## C. One way anova variabel daya hambat

**ANOVA**

Dayahambat

| | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|---|---|---|---|---|---|
| Between Groups | 1469.972 | 7 | 209.996 | 97.014 | .000 |
| Within Groups | 34.633 | 16 | 2.165 | | |
| Total | 1504.605 | 23 | | | |

Dari hasil data anova menunjukkan hasil nilai zig = 0,00 (<0,005) sehingga dapat disimpulkan bahwa data dari kedelapan kelompok terdapat perbedaan. Lebih jelas dapat dilihat perbedaan antar kelompok dari uji post hoc.

## D. Uji post hoc variabel daya hambat

# Post Hoc Test

**Multiple Comparisons**

Dayahambat
Tukey HSD

| (I) Sampel | (J) Sampel | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig. | 95% Confidence Interval | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Lower Bound | Upper Bound |
| 1 | 2 | 19.30000* | 1.20127 | .000 | 15.1410 | 23.4590 |
| | 3 | 24.30000* | 1.20127 | .000 | 20.1410 | 28.4590 |
| | 4 | 20.13333* | 1.20127 | .000 | 15.9743 | 24.2923 |
| | 5 | 23.80000* | 1.20127 | .000 | 19.6410 | 27.9590 |
| | 6 | 11.36667* | 1.20127 | .000 | 7.2077 | 15.5257 |
| | 7 | 22.13333* | 1.20127 | .000 | 17.9743 | 26.2923 |
| | 8 | 23.03333* | 1.20127 | .000 | 18.8743 | 27.1923 |
| 2 | 1 | -19.30000* | 1.20127 | .000 | -23.4590 | -15.1410 |
| | 3 | 5.00000* | 1.20127 | .013 | .8410 | 9.1590 |
| | 4 | .83333 | 1.20127 | .996 | -3.3257 | 4.9923 |
| | 5 | 4.50000* | 1.20127 | .029 | .3410 | 8.6590 |
| | 6 | -7.93333* | 1.20127 | .000 | -12.0923 | -3.7743 |
| | 7 | 2.83333 | 1.20127 | .323 | -1.3257 | 6.9923 |
| | 8 | 3.73333 | 1.20127 | .096 | -.4257 | 7.8923 |
| 3 | 1 | -24.30000* | 1.20127 | .000 | -28.4590 | -20.1410 |
| | 2 | -5.00000* | 1.20127 | .013 | -9.1590 | -.8410 |
| | 4 | -4.16667* | 1.20127 | .049 | -8.3257 | -.0077 |
| | 5 | -.50000 | 1.20127 | 1.000 | -4.6590 | 3.6590 |
| | 6 | -12.93333* | 1.20127 | .000 | -17.0923 | -8.7743 |
| | 7 | -2.16667 | 1.20127 | .627 | -6.3257 | 1.9923 |
| | 8 | -1.26667 | 1.20127 | .958 | -5.4257 | 2.8923 |
| 4 | 1 | -20.13333* | 1.20127 | .000 | -24.2923 | -15.9743 |
| | 2 | -.83333 | 1.20127 | .996 | -4.9923 | 3.3257 |
| | 3 | 4.16667* | 1.20127 | .049 | .0077 | 8.3257 |
| | 5 | 3.66667 | 1.20127 | .106 | -.4923 | 7.8257 |
| | 6 | -8.76667* | 1.20127 | .000 | -12.9257 | -4.6077 |
| | 7 | 2.00000 | 1.20127 | .708 | -2.1590 | 6.1590 |
| | 8 | 2.90000 | 1.20127 | .298 | -1.2590 | 7.0590 |
| 5 | 1 | -23.80000* | 1.20127 | .000 | -27.9590 | -19.6410 |
| | 2 | -4.50000* | 1.20127 | .029 | -8.6590 | -.3410 |
| | 3 | .50000 | 1.20127 | 1.000 | -3.6590 | 4.6590 |
| | 4 | -3.66667 | 1.20127 | .106 | -7.8257 | .4923 |
| | 6 | -12.43333* | 1.20127 | .000 | -16.5923 | -8.2743 |
| | 7 | -1.66667 | 1.20127 | .850 | -5.8257 | 2.4923 |
| | 8 | -.76667 | 1.20127 | .998 | -4.9257 | 3.3923 |
| 6 | 1 | -11.36667* | 1.20127 | .000 | -15.5257 | -7.2077 |
| | 2 | 7.93333* | 1.20127 | .000 | 3.7743 | 12.0923 |
| | 3 | 12.93333* | 1.20127 | .000 | 8.7743 | 17.0923 |
| | 4 | 8.76667* | 1.20127 | .000 | 4.6077 | 12.9257 |
| | 5 | 12.43333* | 1.20127 | .000 | 8.2743 | 16.5923 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 7 | 10.76667* | 1.20127 | .000 | 6.6077 | 14.9257 |
| | 8 | 11.66667* | 1.20127 | .000 | 7.5077 | 15.8257 |
| 7 | 1 | -22.13333* | 1.20127 | .000 | -26.2923 | -17.9743 |
| | 2 | -2.83333 | 1.20127 | .323 | -6.9923 | 1.3257 |
| | 3 | 2.16667 | 1.20127 | .627 | -1.9923 | 6.3257 |
| | 4 | -2.00000 | 1.20127 | .708 | -6.1590 | 2.1590 |
| | 5 | 1.66667 | 1.20127 | .850 | -2.4923 | 5.8257 |
| | 6 | -10.76667* | 1.20127 | .000 | -14.9257 | -6.6077 |
| | 8 | .90000 | 1.20127 | .994 | -3.2590 | 5.0590 |
| 8 | 1 | -23.03333* | 1.20127 | .000 | -27.1923 | -18.8743 |
| | 2 | -3.73333 | 1.20127 | .096 | -7.8923 | .4257 |
| | 3 | 1.26667 | 1.20127 | .958 | -2.8923 | 5.4257 |
| | 4 | -2.90000 | 1.20127 | .298 | -7.0590 | 1.2590 |
| | 5 | .76667 | 1.20127 | .998 | -3.3923 | 4.9257 |
| | 6 | -11.66667* | 1.20127 | .000 | -15.8257 | -7.5077 |
| | 7 | -.90000 | 1.20127 | .994 | -5.0590 | 3.2590 |

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lebih jelas dapat dilihat ada tidaknya perbedaan yang signifikan antar kelompok dari uji post hoc adalah dengan dapat dilihat dari tanda silang (*) pada kolom mean difference yang menunjukkan sig = <0,005. Bahwa terdapat banyak tanda bintang (*) berarti adanya perbedaan yang nyata yaitu pada kombinasi 1:3.

Pada hasil output diatas pada kombinasi 1:3 menunjukkan sig = <0,005 sehingga nilai dapat disimpulkan berbeda nyata.

## Homogeneous Subsets

**Dayahambat**

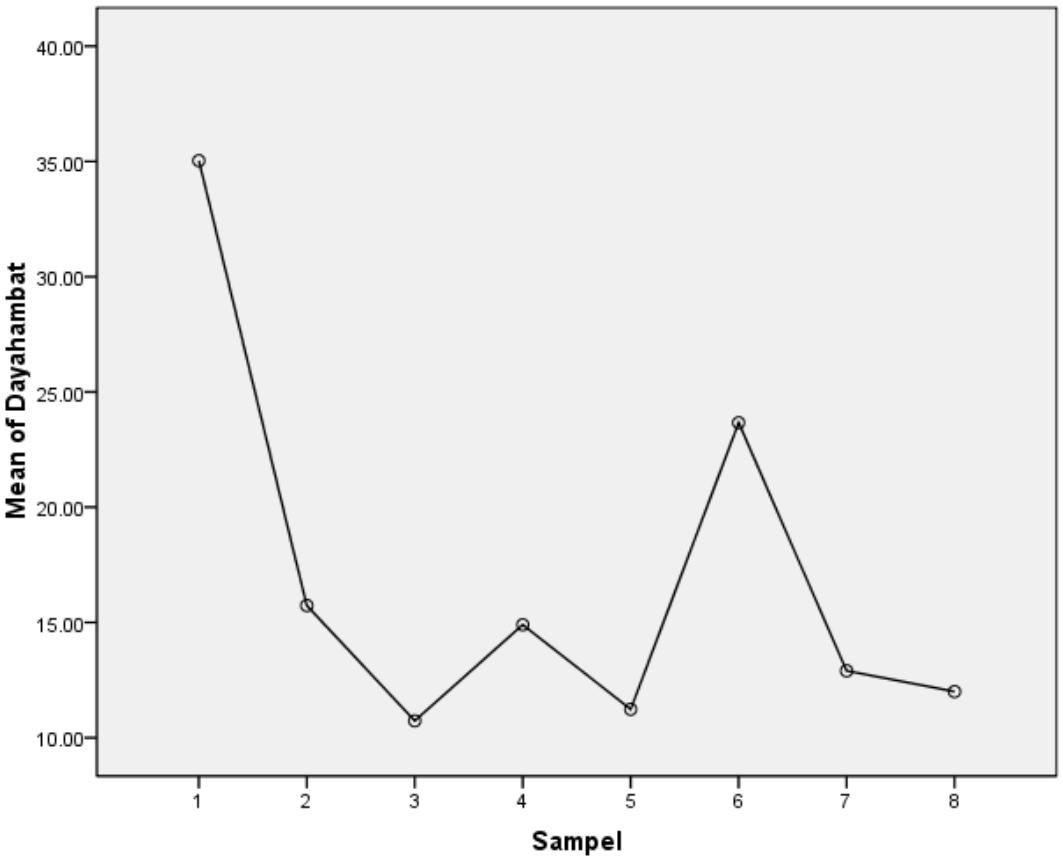
Tukey HSD[a]

| Sampel | N | Subset for alpha = 0.05 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 3 | 3 | 10.7333 | | | | |
| 5 | 3 | 11.2333 | 11.2333 | | | |
| 8 | 3 | 12.0000 | 12.0000 | 12.0000 | | |
| 7 | 3 | 12.9000 | 12.9000 | 12.9000 | | |
| 4 | 3 | | 14.9000 | 14.9000 | | |
| 2 | 3 | | | 15.7333 | | |
| 6 | 3 | | | | 23.6667 | |
| 1 | 3 | | | | | 35.0333 |
| Sig. | | .627 | .106 | .096 | 1.000 | 1.000 |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

**MEANS PLOTS**


40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
Mean of Dayahambat
1
2
3
4
5
6
7
8
Sampel